



UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

500 05 Hradec Králové, Heyrovského 1203, Česká republika,
<http://www.faf.cuni.cz>

tel. +420495067111, fax +420495518002

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

| | |
|---|------------------------------|
| Katedra: farmaceutické chemie a kontroly léčiv | Na akademický rok: 2009/2010 |
|---|------------------------------|

| | |
|-----------------|-------------------|
| Jméno příjmení: | OTO DROBÍK |
|-----------------|-------------------|

| | |
|-------------------|-----------------|
| Studijní program: | farmacie |
|-------------------|-----------------|

| | |
|--------------------------|--|
| Vedoucí diplomové práce: | doc. RNDr. Veronika Opletalová, Ph.D. |
|--------------------------|--|

| | |
|------------------------|--|
| Název diplomové práce: | Sledování interakce pesticidu s acetylcholinesterasou za použití biosenzoru |
|------------------------|--|

| | |
|-------------------------------------|---|
| Název diplomové práce v angličtině: | Following of acetylcholinesterase-pesticide interaction using biosensor technology |
|-------------------------------------|---|

| | |
|-------------------------|---|
| Zásady pro vypracování: | <p>Diplomant bude nejprve seznámen s problematikou biosenzorů. Potom bude provádět in vitro studii, jejímž cílem bude zjistit základní kinetické parametry interakcí pesticid-imobilizovaná cholinesterasa. Teoretická část práce bude sepsána po prostudování literatury související se zadanou problematikou. Experimenty budou prováděny převážně v laboratořích Katedry toxikologie a Centra pokročilých studií Fakulty vojenského zdravotnictví v Hradci Králové podle pokynů školitele a za důsledného dodržování metodických postupů a pravidel bezpečné práce v chemické laboratoři. Na Fakultě vojenského zdravotnictví bude práci diplomanta řídit školitel-specialista RNDr. Miroslav Pohanka, Ph.D. Dosažené výsledky budou kriticky zhodnoceny v diskusi. Závěrečná úprava diplomové práce bude provedena pod vedením doc. Opletalové tak, aby rozsah a členění diplomové práce odpovídaly požadavkům kladeným na práce farmaceuticko-chemického charakteru na Farmaceutické fakultě UK.</p> |
|-------------------------|---|

Seznam odborné literatury:

Chemical Abstracts

Beilstein's Handbuch der organischen Chemie

počítačové databáze (Medline, Web of Science)

originální časopisecká, knižní a patentová literatura

Vymětal, J.: Bibliografické citace dle ČSN ISO 690. Chem. Listy 2001, 95, 431 - 438

Vymětal, J.: Bibliografické citace dle ČSN ISO 690 - oprava chyb. Chem. Listy 2001, 95, 683 - 684

Doporučení redaktorům odborných a popularizačních časopisů přírodovědeckého zaměření, autorům vysokoškolských i středoškolských přírodovědných učebnic a tvůrcům odborných právních textů s touto tematikou. Chem. Listy 2004, 98, 943 - 949

Seznam registrovaných a evidovaných prostředků na ochranu rostlin 2008. Věstník Státní rostlinolékařské správy 2008, 5

Pohanka, M., Kuca, K., Jun, D.: Možnosti využití cholinesteráz ke konstrukci biosenzorů. Vojenské zdravotnické listy 2007, 76, 187-191

Datum zadání diplomové práce: 2008-11-26

Termín odevzdání diplomové práce: 2010-05-15

doc. RNDr. Jiří Klimeš, CSc.

vedoucí katedry

doc. PharmDr. Alexandr Hrabálek, CSc.

děkan fakulty

V Hradci Králové dne: 2008-11-26

Univerzita Karlova v Praze
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Diplomová práce

**Sledování interakce pesticidu s acetylcholinesterasou za
použití biosenzoru**

**Following of acetylcholinesterase-pesticide interaction using
biosensor technology**

Vedoucí práce: doc. RNDr. Veronika Opletalová, Ph.D.

Školitel: RNDr. Miroslav Pohanka, Ph.D.

Hradec Králové 2011

Oto Drobík

Poděkování

Rád bych poděkoval doc. RNDr. Veronice Opletalové, Ph.D. za vedení při vypracování vlastní diplomové práce. Největší poděkování patří mému školiteli RNDr. Miroslavu Pohankovi Ph.D. za jeho cenné rady, pomoc a vedení. A také za to, že mi byl neustále k dispozici a velmi ochotně odpovídal na všechny mé dotazy. Dále děkuji kolektivu na Katedře toxikologie FVZ ÚO za výborné pracovní podmínky při získávání experimentálních dat.

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové 12. 5. 2011

.....

Podpis

Diplomová práce vznikla za podpory grantu SVV-263-001.

Abstrakt

Organofosforové a karbamátové pesticidy jsou toxické látky užívané v zemědělství jako insekticida. Pro člověka jsou tyto látky velmi toxické a akutní otrava může vést až k úmrtí, protože dochází k inhibici acetylcholinesterasy, což vede k nadměrné kumulaci acetylcholinu v organismu.

V rámci diplomové práce byl připraven funkční biosenzor, pro který byl použit standardní tříelektrodový amperometrický senzor vyrobený sítotiskem. Byly testovány senzory s platinovou a uhlíkovou pracovní elektrodou. Dále byla vybrána vhodná metoda elektrochemické detekce, byly optimalizovány některé reakční podmínky a vyhodnoceny kinetické parametry enzymové reakce. Také byly testovány a porovnány různé metody imobilizace acetylcholinesterasy k senzoru a byla vyhodnocena jejich úspěšnost. Jako zástupce pesticidů byly vybrány vzorky paraoxon-methyl a diisopropylfluorofosfát. Byla stanovena mez detekce pro oba pesticidy, která se pohybovala v rozmezí $10^{-6} - 10^{-5}$ mol/l. Pro ověření správnosti získaných výsledků byla rovněž provedena i kontrola pomocí spektrofotometrického stanovení Ellmanovou metodou.

Abstract

Organophosphorus and carbamate pesticides are toxic substances used in agriculture as insecticides. These substances are highly toxic for humans as acute poisoning can lead to death via inhibition of acetylcholinesterase. After acetylcholinesterase inhibition, accumulation of acetylcholine follows.

In compliance with the thesis aims, functional electrochemical biosensor was constructed. It was based on a standard screen printed amperometric sensor with three electrodes. Herein sensors with platinum and carbon working electrode were tested. Suitable method of electrochemical assay was chosen and some the basic conditions were optimized. Kinetic parameters of enzyme reaction were assessed, too. Various methods of acetylcholinesterase capturing onto sensor were tested and compared one to each other. Paraoxon-methyl and diisopropylfluorophosphate were chosen as the representative of pesticides. Limit of detections for the both pesticides were estimated to be $10^{-6} - 10^{-5}$ mol/l. The prepared biosensors were compared with the standard Ellman's method based on spectrophotometry and the methods were substantially correlating.

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| SEZNAM ZKRATEK | 10 |
| 1. ÚVOD..... | 11 |
| 2. TEORETICKÁ ČÁST | 12 |
| 2.1 CHOLINESTERASY | 12 |
| 2.1.1 <i>Acetylcholinesterasa</i> | 12 |
| 2.1.1.1 Acetylcholinové receptory | 13 |
| 2.1.1.2 Molekulární struktura acetylcholinesterasy..... | 13 |
| 2.1.1.3 Hydrolýza acetylcholinu | 14 |
| 2.1.2 <i>Butyrylcholinesterasa</i> | 15 |
| 2.1.2.1 Molekulární struktura butyrylcholinesterasy..... | 15 |
| 2.2 PESTICIDY | 16 |
| 2.2.1 <i>Organofosforové pesticidy</i> | 16 |
| 2.2.1.1 Historie | 16 |
| 2.2.1.2 Obecná struktura organofosforových pesticidů..... | 17 |
| 2.2.1.3 Mechanismus účinku..... | 17 |
| 2.2.1.4 Intoxikace..... | 17 |
| 2.2.1.5 Terapie intoxikace:..... | 19 |
| 2.2.1.6 Chemické struktury vybraných organofosfátových pesticidů..... | 20 |
| 2.2.2 <i>Karbamátové pesticidy</i> | 21 |
| 2.2.2.1 Obecná struktura | 21 |
| 2.2.2.2 Mechanismus účinku..... | 21 |
| 2.2.2.3 Intoxikace..... | 21 |
| 2.2.2.4 Terapie intoxikace..... | 22 |
| 2.2.2.5 Chemické struktury vybraných karbamátových pesticidů..... | 22 |
| 2.3 BIOSENZORY | 23 |
| 2.3.1 <i>Problematika definice biosenzoru</i> | 23 |
| 2.3.2 <i>Elektrochemické biosenzory</i> | 24 |
| 2.3.2.1 Potenciometrické biosenzory | 25 |
| 2.3.2.2 Amperometické biosenzory | 25 |
| 2.3.2.3 Impedimetrické biosenzory | 26 |
| 2.3.3 <i>Hmotnostní převodníky</i> | 27 |
| 2.3.4 <i>Optické převodníky</i> | 27 |
| 2.3.5 <i>Metody imobilizace biorekogničních elementů</i> | 28 |
| 2.3.5.1 Fyzikální imobilizace | 28 |
| 2.3.5.2 Chemická imobilizace..... | 29 |
| 2.3.5.3 Další metody imobilizace..... | 30 |
| 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 31 |
| 3.1 SEZNAM CHEMIKÁLÍ A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ | 31 |
| 3.2 METODIKA | 32 |
| 3.2.1 <i>Stanovení aktivity AChE spektrofotometricky Ellmanovou metodou</i> | 32 |
| 3.2.2 <i>Imobilizační postupy AChE</i> | 32 |
| 3.2.2.1 Imobilizace pouhou adsorpcí AChE na povrch senzoru..... | 32 |
| 3.2.2.2 Imobilizace AChE albuminem za současného provázání glutaraldehydem. | 32 |
| 3.2.2.3 Imobilizace AChE za pomoci želatiny | 32 |
| 3.2.2.4 Imobilizace AChE pomocí sol-gel | 33 |
| 3.2.2.5 Imobilizace AChE do leštěné vrstvy tvořené částicemi grafitu. | 33 |
| 3.2.3 <i>Vyhodnocení optimální reakční koncentrace ATChCl ze saturační křivky</i> | 33 |
| 3.2.3.1 Měření s AChE imobilizovanou pomocí želatiny a čistou absorpcí na senzor..... | 33 |
| 3.2.3.2 Měření spektrofotometricky Ellmanovou metodou..... | 33 |
| 3.2.4 <i>Vyhodnocení optimální metody detekce pesticidů biosenzory</i> | 34 |
| 3.2.4.1 Cyklická voltametrie | 34 |
| 3.2.4.2 Square-wave voltametrie..... | 34 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 3.2.5 | <i>Měření kinetiky reakce podle Michaelis-Mentenové</i> | 35 |
| 3.2.5.1 | Měření pomocí senzoru s AChE imobilizovanou pomocí želatiny a prostou absorpcí. | 35 |
| 3.2.5.2 | Měření spektrofotometricky Ellmanovou metodou..... | 35 |
| 3.2.6 | <i>Měření optimální inkubační doby pro DFP s neimobilizovanou AChE</i> | 36 |
| 3.2.7 | <i>Měření inhibičních křivek AChE s isopropylalkoholem, DFP a paraoxon-methylem</i> | 36 |
| 3.2.7.1 | Měření inhibičních křivek AChE s isopropylalkoholem | 36 |
| 3.2.7.2 | Měření inhibičních křivek AChE kalibrační řadou s DFP..... | 36 |
| 3.2.7.2.1 | AChE imobilizovaná želatinou..... | 36 |
| 3.2.7.2.2 | AChE v homogenní fázi | 37 |
| 3.2.7.2.3 | Kontrolní kalibrační řada DFP pomocí Ellmanovy metody | 37 |
| 3.2.7.3 | Měření inhibičních křivek AChE kalibrační řadou s paraoxon-methylem | 38 |
| 3.2.7.3.1 | AChE imobilizovaná želatinou a prostou adsorpcí..... | 38 |
| 3.2.7.3.2 | AChE neimobilizovaná v roztoku | 38 |
| 3.3 | OCHRANA PŘED TOXICKÝMI LÁTKAMI A ODMOŘOVÁNÍ KONTAMINOVANÝCH PLOCH | 39 |
| 4. | VÝSLEDKY A DISKUSE | 40 |
| 4.1 | VÝBĚR MĚŘICÍ METODY | 40 |
| 4.2 | IMOBILIZACE | 42 |
| 4.3 | INHIBICE AChE ISOPROPYLALKOHOLEM | 43 |
| 4.4 | INKUBAČNÍ DOBA | 44 |
| 4.5 | OPTIMALIZACE REAKČNÍCH PODMÍNEK | 45 |
| 4.6 | KALIBRACE PARAOXON-METHYL A DFP..... | 49 |
| 5. | ZÁVĚR..... | 52 |
| 6. | LITERATURA:..... | 53 |

Seznam zkratk

| | |
|--------|--|
| AChE | acetylcholinesterasa |
| ATChCl | acetylthiocholin-chlorid |
| BuChE | butyrylcholinesterasa |
| CNS | centrální nervová soustava |
| CV | cyklická voltametrie |
| DFP | diisopropylfluorofosfát |
| DTNB | 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoová kyselina) |
| Glu | kyselina glutamová |
| His | histidin |
| ISE | iontově selektivní elektroda |
| KP | karbamátové pesticidy |
| LOD | mez detekce (limit of detection) |
| MTMOS | methyltrimethoxysilan |
| OP | organofosforové pesticidy |
| PEG | polyethylenglykol |
| Phe | fenylalanin |
| Ser | serin |
| SPR | rezonance povrchových plasmonů (surface plasmon resonance) |
| SWV | square-wave voltametrie |
| TMOS | tetramethoxysilan |
| Trp | tryptofan |

1. Úvod

Diplomová práce je zaměřená na sledování interakce pesticidů s acetylcholinesterasou za použití biosenzoru. Organofosforové a karbamátové pesticidy jsou vysoce toxické látky, které jsou inhibitory cholinesteras, a to včetně lidské acetylcholinesterasy a butyrylcholinesterasy. Zároveň to jsou látky, které jsou hojně využívány v zemědělství. V zemích Evropské unie a jiných vyspělých zemí je jejich použití přísně kontrolováno, ovšem v chudých afrických a asijských zemích je nekontrolované používání velmi časté a také v těchto zemích je poměrně značná incidence neúmyslných, ale i úmyslných otrav.

V posledních letech se velké množství odborných prací zabývá využitím biosenzorů, jako vhodných prostředků pro stanovení pesticidů, protože mají několik výhod, jako jsou nízké náklady, rychlost měření, snadnost obsluhy, dostatečná citlivost. Diplomová práce se v teoretické části zabývá definicí biosenzorů, představuje, jaké jsou nejpoužívanější typy biosenzorů, a zabývá se i problematikou zachycení enzymů na biosenzor.

Jedním z cílů práce je připravit funkční biosenzor a použít jej pro stanovení modelových vzorků pesticidů. Pro tento účel budou použity elektrochemické sítotiskové tříelektrodové senzory. Dále je věnována pozornost výběru vhodné elektrochemické metody detekce, volbě vhodného typu imobilizace a stanovení mezí detekce pro kalibrační roztoky organofosforových pesticidů.

2. Teoretická část

2.1 Cholinesterasy

Cholinesterasy jsou obecně enzymy ze skupiny hydrolas, které štěpí estery cholinu. V lidském organismu existují 2 typy cholinesterasy – acetylcholinesterasa (AChE, acetylcholin acetylhydrolasa, E.C. 3.1.1.7) a butyrylcholinesterasa (BuChE acetylcholin acylhydrolasa, E.C. 3.1.1.8) [1].

2.1.1 *Acetylcholinesterasa*

AChE patří mezi velmi významné enzymy v lidském organismu. Podílí se na neurotransmisi v centrální a periferní nervové soustavě. Funkcí AChE je hydrolýza neuromediátoru acetylcholinu, čímž dojde k ukončení přenosu nervového impulzu. [2]. Na rozdíl od BuChE je AChE substrátově výrazně specifický enzym, který primárně hydrolyzuje acetylcholin a k ostatním esterům cholinu je méně aktivní [3]. Nachází se zejména v centrálním a periferním nervovém systému, dále pak na nervosvalové ploténce a v erytrocytech [4].

Acetylcholin je syntetizován z cholinu a acetyl-CoA specifickým enzymem cholinacetyltransferasou (E.C. 2.3.1.6). Cholin je aktivně přijímán z extracelulárního prostoru a Acetyl-CoA vzniká v mitochondriích axonálního zakončení. Acetylcholin se v nervových vláknech skladuje především ve vezikulách a minimálně se vyskytuje extravezikulárně. Když akční potenciál dosáhne nervového zakončení, dochází k iniciaci vstupu iontů Ca^{2+} do nervového zakončení, což umožní splnutí membrány vezikul s plazmatickou membránou nervového zakončení a obsah určitého počtu vezikul se vylije do synaptické štěrby. Množství uvolněného acetylcholinu je úměrné množství kalciových iontů, které vstoupily do cytoplazmy nervového zakončení. Acetylcholin, který byl uvolněn, reaguje s cholinergními receptory na postsynaptické membráně cílové tkáně. Samotná molekula acetylcholinu je s receptorem vázána velmi krátce – asi 2 ms a po uvolnění je okamžitě hydrolyzována pomocí AChE na cholin a acetát [2].

2.1.1.1 *Acetylcholinové receptory*

Acetylcholin uvolněný nervovou stimulací vyvolává své účinky interakcí se dvěma základními typy acetylcholinových receptorů – receptory nikotinovými a muskarinovými. Pomocí selektivních antagonistů a jinými metodami byly identifikovány dva typy nikotinových receptorů a pět typů muskarinových receptorů.

Nikotinové receptory (nAChR) se dále dělí na 2 podtypy. Muskulární se nacházejí především na nervosvalové ploténce. Druhým typem jsou nikotinové receptory neuronální, které se nacházejí na postsynaptické membráně ve vegetativních gangliích a CNS [2,5].

Muskarinové receptory se rozdělují na pět podtypů – M1 až M5, přičemž funkční význam je nejlépe definován u receptorů M1, M2 a M3. Jednotlivé typy muskarinových receptorů se liší lokalizací. M1-receptory (neurální) jsou lokalizovány především v CNS, periferních neuronech a parietálních buňkách žaludku. Zprostředkovávají excitační účinky acetylcholinu. M2-receptory (kardiální) se nacházejí především v srdci a neurálních tkáních. Zprostředkovávají hlavně inhibiční reakce. M3-receptory se nacházejí v exokrinních žlázách, v hladkém svalstvu a endotelu. Zprostředkovávají především excitační účinky acetylcholinu, zvyšují sekreci v žlázách a v hladkých svalech cév zprostředkovávají relaxaci. Funkční význam receptorů M4 a M5 zatím nebyl přesně definován [2,5].

2.1.1.2 *Molekulární struktura acetylcholinesterasy*

Monomer AChE má molekulovou hmotnost okolo 60 000. Prostorovým tvarem je AChE elipsoidní molekula veliká přibližně $45 \times 60 \times 65$ Å. Skládá se z dvanácti centrálně stočených beta skládaných listů, které jsou obklopené čtrnácti alfa helixy [4].

AChE se skládá z několika hlavních domén: aktivního centra, aromatické štěrby a periferního anionického místa.

Aromatická štěrbina je hluboká okolo 20 Å [7]. Štěrbina je lemována čtrnácti aromatickými zbytky, které tvoří cca. 70 % povrchu štěrby [6]. Aromatické zbytky hrají velmi důležitou roli ve stabilizaci celého komplexu díky elektrostatickým a hydrofobním interakcím se substrátem. Ve spodní části štěrby se nachází aktivní centrum [4].

Samotné aktivní centrum se skládá ze dvou podjednotek: esteratické části, která obsahuje tzv. katalytickou triádu, a anionické části, na kterou se váže kvartérní skupina acetylcholinu. U AChE izolované z parejnoka kalifornského (*Torpedo californica*) tvoří katalytickou triádu v esteratické části aktivního centra aminokyseliny Ser200, His440 a Glu327. Serin je v průběhu hydrolýzy acetylcholinu acetylován. Anionická část je tvořena aminokyselinami Trp80, Phe330 a Phe331. Jeho role je taková, že na anionickou část se váže kvartérní skupina acetylcholinu a tím dochází ke správné prostorové orientaci acetylcholinu [4,6,7].

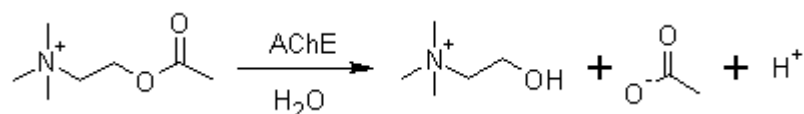
Periferní anionické místo se nachází na vstupu do aromatické štěrbině. Váží se na něj alosterické aktivátory i inhibitory. Ovšem zatím není přesně znám molekulární mechanismus, jakým ovlivňuje vazba aktivátoru nebo inhibitoru samotnou katalytickou aktivitu enzymu AChE. Navázaný ligand může stericky bránit vstupu do aromatické štěrbině nebo může ligand odpuzovat odlišně nabitý substrát od aktivního centra. Případně může dojít k přímému ovlivnění konformace aktivního centra. Např. je známa interakce mezi Trp286, který se nachází na periferním anionickém místě enzymu, a Trp86, který je v aktivním centru. Při vazbě inhibitoru nebo aktivátoru na Trp286, dojde k ovlivnění konformace Trp86, což má za následek změnu aktivity enzymu. [4,7]

2.1.1.3 Hydrolýza acetylcholinu

Tryptofanová skupina v anionické části aktivního centra má negativní dílčí náboj, který interaguje s kladně nabitým dusíkem substrátu [4].

V esteratické části se nachází serin, jehož hydroxylový zbytek nukleofilně atakuje elektrofilní uhlík acetylcholinu. Dojde k rozštěpení esteru a dočasné kovalentní vazbě acylu na hydroxylovou skupinu serinu. Imidazolový dusík histidinu může tvořit vodíkovou vazbu s hydroxylovou skupinou serinu a tím podporovat nukleofilní reakci. Imidazolová skupina může usnadnit přenos acylové skupiny z hydroxylu na molekulu vody. Dochází pak k rapidní hydrolýze acylovaných enzymů, přičemž vzniká kyselina octová a esteratická část enzymu je obnovena [4,5].

Hydrolýzu acetylcholinu lze znázornit rovnicí 1.



(rovnice 1)

2.1.2 *Butyrylcholinesterasa*

BuChE také patří mezi hydrolázy cholinu, ale je méně substrátově specifická než AChE. Je přítomna v plazmě a má více než jedenáct isoenzymových variant. Dále se nachází v játrech, hladkém svalstvu, střevech, slinivce břišní a srdci. V centrálním a periferním nervovém systému se nachází jen omezeně [1,3,4].

V posledních letech roste farmakologický a toxikologický význam BuChE, protože se ukazuje, že BuChE je schopna odštěpovat hydrofobní i hydrofilní karboxylové kyseliny a také hydrolyzovat sloučeniny, které obsahují kyselinu fosforečnou. Navíc je schopná odbourávat inhibitory cholinesteras ještě předtím, než dosáhnou synapsí [1].

Protože je BuChE méně substrátově specifická, přednostně rozkládá jiné substráty než acetylcholin, např. také butyrylcholin, i prokain, suxamethonium a propanidid. [2]. Dále pak organofosforové inhibitory a karbamáty, kokain, kyselinu acetylsalicylovou, amitriptylin. BuChE funguje i jako aktivátor proléčiv. Například proléčivo bambuterol konvertuje na terbutalin [1].

2.1.2.1 *Molekulární struktura butyrylcholinesterasy*

AChE a BuChE jsou strukturou blízké. Jejich DNA se shoduje v 65 % kodonů. Molekuly mají podobnou molekulární strukturu a podobná aktivní centra [1]. Molekulu BuChE tvoří čtyři stejné podjednotky. Každý monomer obsahuje 574 aminokyselin a 9 sacharidových řetězců, které jsou připojené na asparaginová rezidua. Monomer má ve své struktuře také 3 disulfidické můstky, které pomáhají udržet správnou prostorovou globulární strukturu. Monomery a dimery spojené disulfidickými můstky tvoří tetramer pomocí hydrofobních interakcí přes aromatické aminokyseliny a jejich karboxyly. [1,4]

2.2 Pesticidy

Pod pojmem pesticidy rozumíme látky, které účinkují proti takovým zvířecím a rostlinným organizmům, které mohou člověku přímo nebo nepřímo škodit. Mezi pesticidy patří tyto skupiny: insekticidy, arachnicidy, rodenticidy, moluskocidy, herbicidy, fungicidy [5].

Použití pesticidů v ČR upravuje zákon č. 326/2004 Sb. o rostlinolékařské péči, ve znění zákona č. 626/2004 Sb., zákona č. 444/2005 Sb., zákona č. 131/2006 Sb., zákona č. 249/2008 Sb. a směrnice ES č. 91/414/EEC. V ČR mohou být používány pro ochranu rostlin jen ty přípravky, které jsou uvedené v Seznamu registrovaných prostředků na ochranu rostlin [8].

Ve vyspělém světě jsou pesticidy pod přísnou kontrolou, ovšem v rozvojových zemích daleko méně. Celkově na světě ročně umírá 250 000 až 370 000 lidí na otravu pesticidy [9]. Z toho přibližně 63 % z celkového počtu úmrtí dochází v jižní a jihovýchodní Asii [10]. Vyšší úmrtnost je také spojená s tím, že v rozvojových zemích je množství doma uchovávaných pesticidů mnohem vyšší a tím se i zvyšuje riziko otravy [9].

Z důvodu značné toxicity jsou nejvíce sledovanou a studovanou skupinou pesticidů organofosforové a karbamátové pesticidy.

2.2.1 *Organofosforové pesticidy*

Organofosforové pesticidy (OP) mají velmi silné insekticidní účinky a po použití se rychle rozpadají. Proto se široce používají v ochraně rostlin. Nevýhodou OP je jejich vysoká akutní toxicita pro člověka a pro vyšší živočichy. Jejich velkou předností je jejich chemická nestabilita. Díky tomu jsou zemědělské produkty požitelné po poměrně krátké době a nedochází ke kumulaci [5].

2.2.1.1 *Historie*

První experimenty se syntézou organofosforových sloučenin sahají až do druhé poloviny 18. Století. V Německu ve 30. letech probíhal výzkum nových druhů organofosforových insekticidů. Brzo se ukázala i mimořádná toxicita některých organofosforových sloučenin a následně došlo v nacistickém Německu k utajení celého

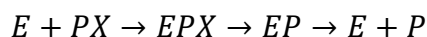
výzkumu a jeho přeorientování na výzkum bojových látek. V roce 1937 byl syntetizován tabun (dimethylamino-kyanofosfát) a v roce 1938 byl syntetizován sarin (*O*-isopropyl-methylfosfát) [8,11]. Výzkum nervově paralytických látek pokračuje dodnes. Stejně tak pokračuje i výzkum organofosforových pesticidů.

2.2.1.2 *Obecná struktura organofosforových pesticidů*

Organofosforové sloučeniny jsou odvozené od kyseliny fosforečné a fosfonové. Nervově paralytické bojové látky jsou nejčastěji deriváty kyseliny fosforečné. OP jsou převážně deriváty kyseliny fosfonové.

2.2.1.3 *Mechanismus účinku*

OP jsou inhibitory cholinesteras. Klinicky je podstatnější inhibice AChE. Při inhibici dochází ke kumulaci acetylcholinu. Mechanismus účinku spočívá v tom, že OP se váží na aktivní centrum – esteratické místo. OP se svým fosforem kovalentně váže na hydroxylovou skupinu serinu. Inhibici popisuje rovnice 2.



(rovnice 2)

AChE (E) vytvoří s organofosforovým inhibitorem (PX) přechodný komplex (EPX), dojde k uvolnění skupiny (X) a výsledkem celého procesu je komplex (EP). Vzniklý komplex EP je poměrně stabilní a rychlost jeho rozpadu velmi nízká. Spontánní regenerace enzymu je obvykle velmi pomalá a trvá v řádu hodin až několika dní. Proto je inhibice AChE organofosforovými sloučeninami považována za prakticky ireverzibilní [4,12].

2.2.1.4 *Intoxikace*

OP jsou vysoce lipofilní látky, výjimku tvoří OP, které obsahují kvartérní dusík ve své molekule [2]. Vysoká lipofilita zapříčiňuje, že OP velmi lehce prochází všemi bariérami, včetně kůže. To je také důvod, proč se často intoxikace rozvíjí velmi rychle a k úmrtí může dojít i během několika minut.

Dochází k inhibici jak AChE, tak i BuChE. Ovšem akutní inhibice BuChE má menší klinický význam, ve srovnání s inhibicí AChE. Výsledkem inhibice AChE je

nadměrná kumulace acetylcholinu a tím i nadměrná stimulace acetylcholinových receptorů v synapsích periferního centrálního systému a CNS. Dochází rovněž k nadměrné stimulaci na nervosvalových ploténkách [14]. Projevy intoxikace OP udává tabulka 1.

Tab.1: Klinické projevy intoxikace OP [13,14]

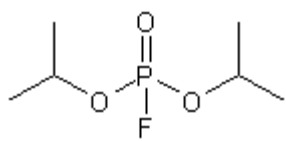
| |
|---|
| <p>Typické symptomy stimulace muskarinových receptorů:</p> <p><i>Mióza</i> <i>Bradykardie</i> <i>Hypotenze</i> <i>Průjem</i> <i>Inkontinence moči</i> <i>Bronchokonstrikce</i> <i>Bronchorrhoea</i> <i>Zvracení</i> <i>Slinění</i> <i>Srdeční arytmie</i></p> |
| <p>Typické symptomy stimulace nikotinových receptorů:</p> <p><i>Svalové záškuby</i> <i>Třes</i> <i>Pocení</i> <i>Tachykardie</i> <i>Mydriáza</i> <i>Svalová slabost s respiračním selháním</i> <i>Hypertenze</i></p> |
| <p>Kumulace acetylcholinu v CNS způsobí:</p> <p><i>Zmatenost</i> <i>Neklid</i> <i>Koma</i> <i>Respirační selhání</i></p> |
| <p>Symptomy nadměrné stimulace acetylcholinem v nervosvalových spojeních:</p> <p><i>Křeče, později se rozvíjí svalová slabost</i> <i>Paralýza</i></p> |

2.2.1.5 *Terapie intoxikace:*

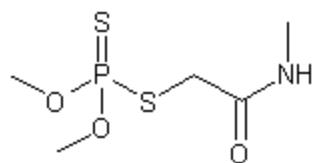
Základní opatření při intoxikaci je zabránění dalšímu vstřebávání, dále řízené dýchání, podání diazepamů z důvodu zahájení protikřečové léčby. Podstatné je i okamžité podávání vysokých dávek atropinu až do projevu předávkování [15].

Dále nabývají na významu reaktivátory AChE. Jsou oximy – látky obsahující skupinu $R-CH=NOH$. Jejich účinek je založen na tom, že OP mají vyšší afinitu k oximům než k AChE. Při reaktivaci AChE dochází ke vzniku komplexu OP + oxim a uvolňuje se aktivní AChE. Reaktivátory se musí podávat co nejdříve po intoxikaci, protože komplex AChE + OP postupně „stárne“ a později oximy nejsou schopné enzym reaktivovat. Nejvýznamnější reaktivátory jsou trimedoxim, pralidoxim, obidoxim [4,14,16].

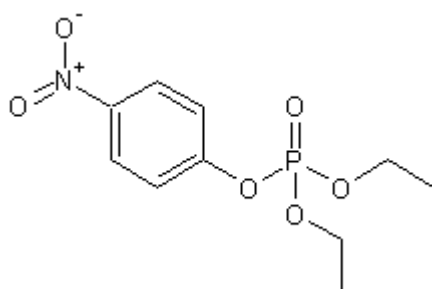
2.2.1.6 Chemické struktury vybraných organofosfátových pesticidů



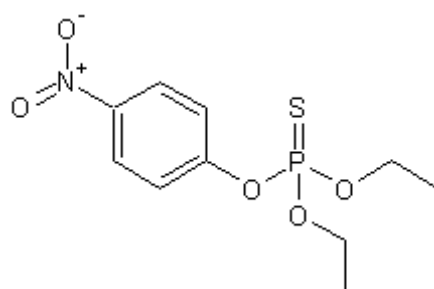
diisopropylfluorofosfát



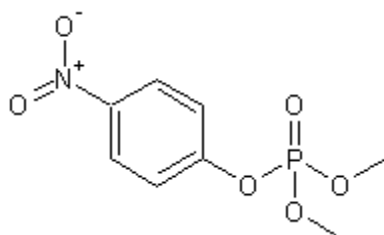
dimethoát



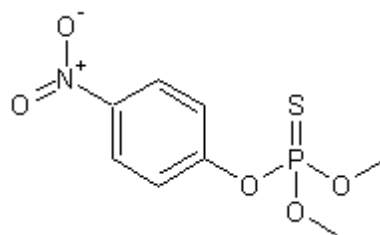
paraoxon-ethyl



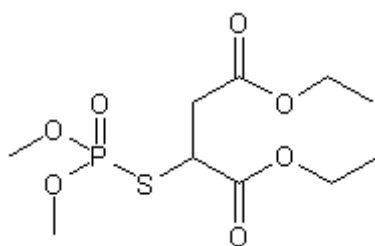
parathion-ethyl



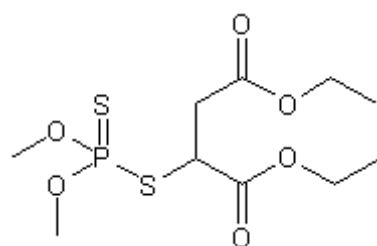
paraoxon-methyl



parathion-methyl



malaoxon



malathion

2.2.2 Karbamátové pesticidy

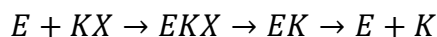
Karbamátové pesticidy (KP) mají široké spektrum užití. Slouží jako insekticidy, nematocidy, fungicidy atd. Některé karbamáty se používají i jako léčiva, např. fysostigmin, pyridostigmin. Momentálně není toxický účinek na organismus tak výrazně sledován a zkoumán jako u OP, přestože některé KP jsou podezřelé z karcinogenního a mutagenního účinku. Dokonce se uvažovalo o použití karbamátů jako chemických zbraní.

2.2.2.1 Obecná struktura

Obvykle se jedná o *N*-methylové nebo *N,N*-dimethylové karbamáty. *N*-methylové karbamáty jsou častější a významnější. Nenabitě a lipofilní karbamáty se nejčastěji uplatňují jako insekticidy [4].

2.2.2.2 Mechanismus účinku

KP jsou stejně jako OP inhibitory AChE [14]. Vážou se v esteratickém místě aktivního centra na hydroxylovou skupinu serinu. Výsledkem je karbamoylace AChE. Obecně lze inhibici AChE popsat pomocí rovnice 3.



(rovnice 3)

AChE (E) tvoří s karbamátovým pesticidem (KX) přechodný komplex (EKX), dojde k uvolnění skupiny (X) a výsledkem je karbamoylovaný komplex (EK). Stabilita komplexu EK je do značné míry závislá na charakteru konkrétního karbamátu a dochází k spontánní dekarbamoylaci na volný enzym (E) a karbamát (K). Spontánní dekarbamoylace je poměrně rychlá a poločas rozpadu již od 20 do 60 minut [4].

2.2.2.3 Intoxikace

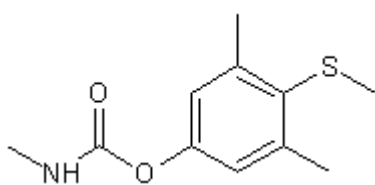
KP špatně prochází přes hematoencefalickou bariéru, některé vůbec. Symptomy, které jsou důsledkem proniknutí OP do CNS, u KP chybí úplně nebo jsou minimální. Projevy bývají: zvracení, bolest hlavy, nadměrné slinění, závratě. Případně se projeví křeče kosterního svalstva a následné ochabnutí. Při velmi závažné intoxikaci může dojít k bronchospasmu, ztíženému dýchání a ochabnutí dýchacích svalů. U otrav

karbamáty je důležité, že během několika hodin obvykle dochází ke spontánnímu zlepšení stavu pacienta, většina projevů intoxikace postupně vymizí. Důvodem je spontánní dekarbamoylace AChE a tím obnovení její fyziologické funkce [4,14, 17].

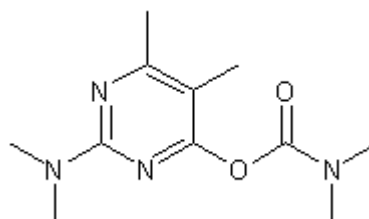
2.2.2.4 *Terapie intoxikace*

Akutní otrava KP je léčena obdobně jako u otrav OP. Podává se atropin a případně se přistoupí k řízenému dýchání. Na rozdíl od otrav OP, se nepodávají reaktivátory AChE [14].

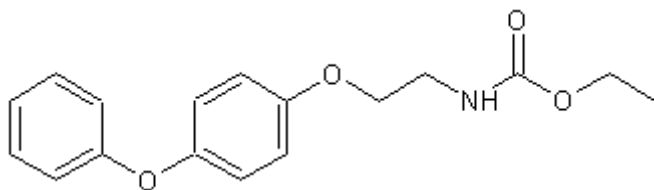
2.2.2.5 *Chemické struktury vybraných karbamátových pesticidů*



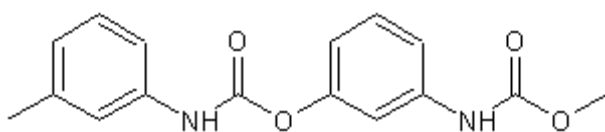
methiokarb



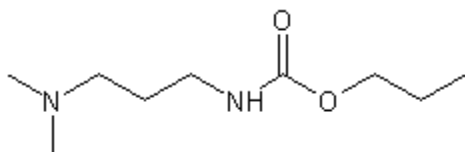
pirimikarb



fenoxycarb



fenmedifam



propamokarb

2.3 Biosenzory

V roce 1962, profesor Leland Clark, představil svůj první biosenzor, který se začal od roku 1975 komerčně vyrábět. I když ve značně upravené formě se používá dodnes a dalo by se říci, že se jedná o komerčně nejúspěšnější a nejpoužívanější biosenzor. Clark představil biosenzor, kterým byla chronoamperometrická elektroda s navázaným enzymem glukosaoxidas. Takto vznikl první biosenzor pro stanovení glukosy, který se dále vyvinul v osobní glukometr pro diabetiky [18]. Obrovský rozvoj ve vývoji biosenzorů nastal v osmdesátých letech 20. století a to díky rozvoji, dostupnosti a miniaturizaci polovodičů.

2.3.1 Problematika definice biosenzoru

Z důvodu, že různí autoři používali pojem biosenzor pro různá zařízení a označení nebylo jednotné, v roce 1992 IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) přidělila biosenzoru obecnou definici:

Biosensor: A device that uses specific biochemical reactions mediated by isolated enzymes, immunosystems, tissues, organelles or whole cells to detect chemical compounds usually by electrical, thermal or optical signals.

V překladu: biosenzor je zařízení, které užívá specifické biochemické reakce zprostředkované izolovaným enzymem, imunosystémem, organelami nebo celými buňkami pro detekci chemických sloučenin, obvykle pomocí elektrického, termálního nebo optického signálu [19].

Ovšem prakticky je definice biosenzoru složitě použitelná. Definice uvádí, že biosenzor se považuje za zařízení, kterým se detekují jen chemické sloučeniny, což neodpovídá reálnému a běžnému užití biosenzoru. Dále pak nejsou úplně přesně vymezeny prvky biologické povahy. Proto se v odborné literatuře požívá trochu odlišná charakterizace biosenzoru: biosenzor je analytické zařízení, které se skládá ze tří komponent [20]. První komponenta je prvek přírodního původu, tzv. biorekogniční element, což může být enzym, protilátka, tkáň, organela atd. Druhým prvkem biosenzoru je fyzikálně-chemický převodník. Třetím prvkem je detektor. Dále je pro

správnou definici zařízení typu biosenzor podstatné to, že biorekogniční element je pevně spojený s fyzikálně-chemickým převodníkem [20,21].

Biorekogniční elementy můžeme rozdělit na dva základní typy podle toho, jak reagují s analytem [20].

- 1) Biokatalytický rekogniční element přeměňuje analyt na jinou formu a vzniklý produkt je stanovován.
- 2) Bioafinitní rekogniční element selektivně reaguje s analytem. Vytváří se komplex, například protilátka-antigen, úsek DNA-stanovení specifických sekvencí.

Druhým podstatným prvkem biosenzoru je fyzikálně-chemický převodník. Funkcí převodníku je to, že zajišťuje převod interakce biorekogničního elementu s analytem do fyzikálně měřitelné veličiny.

Podle fyzikálně-chemického převodníku můžeme biosenzory rozdělit na tři typy – elektrochemické, hmotnostní a optické [20-22].

2.3.2 Elektrochemické biosenzory

Pro elektrochemické biosenzory je obvykle typické, že obsahují vhodný enzym v biorekogničním elementu biosenzoru. Enzym poskytuje elektroaktivní substance, které jsou detekovány pomocí fyzikálně-chemického převodníku. V dalších případech může být enzym použit jako značka navázaná na protilátku nebo oligonukleotid se specifickou sekvencí [20,23].

U biosenzorů, které se používají pro stanovení metabolitů nebo při stanovování průmyslově využívaných organických látek, se většinou používají enzymy ze skupiny oxidoreduktas. Jako příklad může posloužit glukosaoxidas nebo glukosadehydrogenasa, používané v osobních glukometrech.

Podle použitého fyzikálně-chemického převodníku se rozlišují biosenzory na potenciometrické, amperometrické a impedimetrické. [18].

2.3.2.1 Potenciometrické biosenzory

U potenciometrických biosenzorů se jako fyzikálně-chemický převodník používá iontově selektivní elektroda (ISE). Princip je takový, že během měření s ISE soustavou neprochází žádný proud, pouze je akumulován potenciál na rozhraní iontově selektivní membrány. Na povrchu membrány ISE se obvykle nachází biorekogniční element. Dříve se jako ISE používala skleněná pH elektroda. Díky rozvoji polovodičů je trendem používat biosenzory, které obsahují i desítky ISE, nebo ISFET (ion-selective field effect transistor) a LAPS (light addressable potentiometric sensor). Použitá elektroda se volí podle toho, jak je schopna selektivně vnímat přítomnost iontu, který je uvolněný nebo spotřebovaný při samotné enzymové reakci [20,22,23].

Jako příklad opět může posloužit glukosaoxidas. Enzym je imobilizovaný na povrchu pH elektrody. Samotná glukosa, která vstupuje do reakce, má minimální vliv na pH roztoku. Glukosa je oxidována glukosaoxidasou a glukonová kyselina, která vystupuje z reakce, okyseluje roztok a tato změna je zaznamenána pomocí pH elektrody [20].

2.3.2.2 Amperometické biosenzory

Amperometrické biosenzory jsou citlivější a také mnohem vhodnější pro masové, komerční využití než biosenzory potenciometrické.

Jsou známé též jako voltametrické biosenzory a fungují na principu, kdy díky redoxní reakci dochází ke vzniku Faradayova proudu, který je sledován. Amperometrické biosenzory umožňují použít několik metod voltametrických sledování. Při měření se lineárně zvyšuje napětí do zvolené hodnoty u cyklické voltametrie (CV) a u linear sweep voltametrie. U CV, po dosažení cílové hodnoty napětí, je zpětně lineárně napětí snižováno. Dále se používá tzv. square-wave voltametrie (SWV) a diferenční pulzní voltametrie. Pro praktické použití se nejčastěji používá chronoamperometrie, též známá jen jako amperometrie. Při této metodě je fixně nastaveno vložené napětí a Faradayův proud se měří v určitém časovém úseku nebo nepřetržitě [18,20].

Jako pracovní elektroda se používá drát z drahého kovu. Praktičtější formou je elektroda vytvořená sítotiskem. Sítotiskem se vytvoří elektroda obsahující tenkou vrstvu drahého kovu (platina, zlato) a zároveň je elektroda pokryta biorekogničním elementem.

Výhodou platinových elektrod je to, že je chemicky rezistentní. Cenově výhodnější může být další varianta amperometického biosenzoru. Používá se pasta, nejčastěji uhlíková, do které je suspendován enzym [20,23,24].

Při přeměně substrátu enzymem vzniká proud, který prochází elektrodo­vým systémem. Většinou se pohybuje v rozmezí nA až μ A. Někdy se do soustavy vkládá tzv. vložené napětí mezi referenční a pracovní elektrodu. Důvodem je, že v některých případech není enzymová reakce dostatečně detekovatelná [20].

Amperometrické biosenzory se používají ve dvou typech elektrodo­vého uspořádání: dvou nebo tří elektrodo­vé. Dvouelektrodo­vé uspořádání se skládá z referenční a pracovní elektrody, na které je imobilizovaná biorekogniční složka. Největší nevýhodou dvouelektrodo­vého uspořádání je zkrácený linární rozsah. Důvodem je to, že referenční elektrody mají zvýšený přechodový odpor. Proto dochází k úbytku napětí na povrchu referenční elektrody při vyšším elektrickém proudu, což vede ke zkrácení lineárního rozsahu. Tento problém řeší tříelektrodo­vé uspořádání. Tříelektrodo­vý biosenzor obsahuje, kromě referenční a pracovní elektrody, navíc pomocnou elektrodu, která je zpravidla ze zlata nebo platiny. V tříelektrodo­vém uspořádání se nastavuje napětí mezi referenční a pracovní elektrodou. Ale následně systémem prochází proud mezi pracovní a pomocnou elektrodou [20,23].

2.3.2.3 Impedimetrické biosenzory

Impedimetrické biosenzory zaznamenávají změnu impedance (Z) nebo její komponenty – rezistenci (R) nebo kapacitanci (C). Induktance, která je také jedna z komponent, se pro potřeby biosenzorů zanedbává, protože má minimální vliv na celkovou impedanci [23].

Biosenzory, které využívají změnu resistance, se nazývají konduktometrické. Rezistance je převrácená hodnota konduktance [20].

Impedimetrické biosenzory se skládají ze dvou elektrod, přičemž jedna z elektrod má imobilizovanou biorekogniční složku. Na obě elektrody se přivádí střídavé napětí s amplitudou kolem 100 mV a celý senzor je součástí Wheatstoneova můstku. Impedimetrické biosenzory mají jednu zásadní nevýhodu, jsou vysoce citlivé k interferujícím látkám, což může být jakýkoliv elektrolyt, který vzniká při měření [23].

Používají se ke stanovení močoviny za použití ureasy nebo se používají při monitorování růstu mikroorganismů. Principem je sledování impedance metabolitů, které jsou vylučovány do média. Ale obecně se impedimetrické biosenzory používají daleko méně, než amperometrické a potenciometrické biosenzory [20].

2.3.3 Hmotnostní převodníky

Hmotnostní převodníky reagují přímo na změnu hmotnosti látky, která je vázána na povrchu biosenzoru. Z této skupiny se nejvíce rozšířily biosenzory založené na piezoelektrickém jevu. Piezoelektrický jev je založen na tom, že krystaly bez centra symetrie (tzv. anizotropní krystaly), jsou schopny při mechanickém namáhání generovat orientované dipóly. Tento jev funguje i opačně, přivedení elektrického napětí se projeví mechanickou deformací. Zjednodušeně lze popsat princip fungování piezoelektrického biosenzoru tak, že piezoelektrický senzor kmitá určitou frekvencí. Biosenzor je součástí elektrického širokopásmového oscilačního obvodu a frekvenční čítač měří frekvenci kmitů v oscilačním obvodu. Pokud se na povrch naváže nějaká látka a zároveň nedojde ke změně viskozity a hustoty, je změna rezonanční frekvence přímo úměrná hmotnosti navázané látky. Na povrchu musí být imobilizován biorekogniční element, který zajišťuje potřebnou selektivitu pro stanovovaný analyt. Jako biorekogniční elementy se u piezoelektrických biosenzorů obvykle používají navázané protilátky nebo antigeny. Jejich výhodou je nízká pořizovací cena, přímá detekce a není potřeba nákladných reagensů. Vzhledem k tomu, že reagují na hmotnost navázaného analytu, používají se pro detekci makromolekulárních látek nebo mikroorganismů [22,25].

2.3.4 Optické převodníky

Optické převodníky využívají interakce světelného záření s analytem nebo jinými chemickými látkami, které vznikly při interakci analytu s biorekogničním elementem. Existují tři základní technologické možnosti měření. Pomocí absorpční spektrofotometrie, fluorometrie a nelineární optiky.

Absorpční spektrofotometrie vychází ze známého Lambert-Beerova zákona o absorpci záření. U fluorometrie je měřená emise záření o delší vlnové délce jako produkt vnitromolekulárních singletových přechodů elektronů po absorpci budícího

záření. Biosenzory, které využívají nelineární optiku, sice využívají optické záření pro vyvolání signálu, ovšem výstupní signál je založen na elektromagnetickém principu. Principem je měření rezonance povrchových plasmonů (SPR). Zařízení obsahuje optický hranol, který je z jedné strany pokrytý vrstvou kovu nebo polokovu. Při průchodu světla hranolem dochází k interakci fotonů s elektrony atomů kovu. Tento jev je provázen elektromagnetickým zářením, které se šíří na rozhraní kov/optický hranol (dielektrikum). Tento jev vzniká jen při předpokladu, že foton dopadá na vrstvu kovu pod určitým úhlem. Úhel dopadu je závislý na dané vrstvě kovu. Pokud je na vnějším povrchu kovu imobilizován biorekogniční element a dojde k interakci analytu s biorekogničním elementem, dojde k posunu úhlu dopadu fotonů. Při použití tohoto optického převodníku je výhodné, že stanovovaný analyt se nemusí značit, což je výhodné zejména pro sledování specifických interakcí protilátek se zachyceným antigenem, vazby patogenního mikroorganismu na zachycenou protilátku nebo při sledování hybridizace oligonukleotidů. V dnešní době lze touto metodou stanovovat i látky s molekulovou hmotností nad 200 Da. [20,22].

2.3.5 Metody imobilizace biorekogničních elementů

Aby zařízení bylo klasifikováno jako biosenzor, musí mimo jiné splnit i podmínku, že biorekogniční element je pevně spojen s fyzikálně-chemickým převodníkem. Existuje nepřeberné množství způsobů imobilizace biorekogničního elementu, ovšem musí se vždy správně volit vzhledem k charakteru imobilizované látky a zároveň se musí zohlednit charakter měřeného analytu. Přestože je množství způsobů imobilizace velké množství, lze vysledovat dvě základní metody imobilizace. Fyzikální a chemickou imobilizaci.

2.3.5.1 Fyzikální imobilizace

Pro fyzikální imobilizaci se občas užívá i název mechanická imobilizace. Je založená na zachycení biorekogničního elementu k povrchu převodníku bez chemické reakce mezi maticí převodníku a biorekogničním elementem.

Nejjednodušším způsobem fyzikální imobilizace je jednoduchá absorpce na povrch. Ovšem prakticky je téměř nepoužitelná, protože lze očekávat, že biorekogniční

element se postupně vymývá z povrchu a tím dochází i ke snižování citlivosti a přesnosti měření [20].

Dalším poměrně jednoduchým způsobem imobilizace biorekogniční složky je její zachycení enzymu do uhlíkové pasty. Tato metoda se používá pouze výhradně u voltametrických biosenzorů [26].

Běžným a zároveň technologicky vyspělejším způsobem jsou metody založené na tvorbě membrány *in situ* a zachycení biorekogničního elementu do tvořící se membrány. Želatina se používá jako levná látka použitelná pro tvorbu membrán. Vodná suspenze nabobtnalé želatiny s přídavkem biorekogničního elementu se přímo injektuje na povrch fyzikálně-chemického převodníku a nechá se zaschnout. Obdobně lze připravit membránu s pomocí albuminu s glutaraldehydem [26]. Případně se do směsi přidává modifikátor, který může zlepšovat elektrochemické vlastnosti.

Velmi využívané jsou membrány, které jsou založené na polyakrylamidu. Polyakrylamidová membrána vzniká ze dvou složek: akrylamidu a bisakrylamidu. Vhodným poměrem smísení těchto dvou látek můžeme upravovat velikost pórů. Další látky, které jsou vhodné a schopné polymerace, jsou polyvinylalkohol, algináty, latexy, polypyrrol [20].

V případě, že je matrice fyzikálně-chemického převodníku tvořena sklem, oxidem křemičitým, plastickými hmotami apod., je vhodná metoda imobilizace sol-gel. Sol-gel membrána obsahuje kovy nebo polokovy, tvoří vysoce uspořádané 3D síto s definovanou velikostí vnitřních kavit. 3D síto je tvořené z uspořádaných vrstev, které vznikají hydrolysou a polykondenzací alkoxidů nebo chloridů kovu nebo polokovů [20].

2.3.5.2 Chemická imobilizace

Při chemické imobilizaci vzniká přímá chemická vazba mezi fyzikálně-chemickým převodníkem a biorekogničním elementem. Biorekogniční element poskytuje pro vazbu některou ze svých volných funkčních skupin. Problémem je, že povrch některých fyzikálně-chemických převodníků je značně inertní, proto se musí před imobilizací upravit. U elektrod z drahých kovů se používá modifikace povrchu spontánním vytvořením monovrstev – SAM (self-assembled monolayer).

Polysacharidy se používají jako vhodná matrice pro zachycení biorekogničního elementu. Některé komerčně dodávané převodníky mají povrch pokrytý

karboxycelulosou. Jindy se biorekogniční element chemicky váže na karboxylovaný povrch [20].

2.3.5.3 Další metody imobilizace

Zajímavou metodou imobilizace je navázání biorekogničního elementu na povrch magnetických mikročástic. Celý konjugát je následně magneticky přitažen k povrchu měřicího senzoru nebo na dno kyvety. Začínají se používat i nanočástice, např. grafitová nanovlákná nebo fullereny. Na tyto částice s upraveným povrchem se vlastní biorekogniční element imobilizuje vhodnou metodou [20].

3. Experimentální část

3.1 Seznam chemikálií a přístrojové vybavení

Chemikálie

- Úhoří acetylcholinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7, 1000 U/mg, Sigma-Aldrich, MO, USA, aktivita upravená na $2,0 \times 10^{-8}$ kat/ μ l)
- 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoová kyselina) (DTNB, 99%, Sigma-Aldrich)
- Acetylthiocholin-chlorid (ATChCl, 99% TLC, Sigma-Aldrich)
- Albumin (bovinní, p.a., Sigma-Aldrich)
- Glutaraldehyd (p.a., Sigma-Aldrich)
- Želatina (p.a., Merck, NJ, USA)
- Tetramethoxysilan (TMOS, p.a., Sigma-Aldrich)
- Methyltrimethoxysilan (MTMOS, p.a., Sigma-Aldrich)
- Polyethylenglykol (PEG, 600 Da, p.a., Sigma-Aldrich)
- Sfěrické částice grafitu (prášek, velikost částic 2 – 12 μ m, Sigma-Aldrich)
- Diisopropylfluorfosfát (DFP, Sigma-Aldrich)
- Isopropylalkohol (99,5%, Sigma-Aldrich)
- Paraoxon-methyl (p.a., Sigma-Aldrich)
- fosfátový pufr o koncentraci 0,1 mol/l a pH 7,4

Přístroje:

- Spektrofotometr Helios α (Thermo Electron Corporation, Velká Británie)
- Potenciostat PalmSens (Palm Instruments, Houten, Nizozemsko)
- Software PSLite 1.8.0 (Palm Instruments)
- Třepačka Lab dancer (Ika, Německo)
- Notebook, operační systém Windows XP
- Sítotiskové amperometické senzory tříelektrodové, rozměry $25,40 \times 7,26 \times 0,63$ mm, průměr pracovní elektrody 1 mm, pracovní elektroda platinová, referenční elektroda Ag/AgCl, pomocná elektroda platinová (BVT Technologies, Brno, ČR).
- Sítotiskové amperometické senzory tříelektrodové, rozměry $25,40 \times 7,26 \times 0,63$ mm, průměr pracovní elektrody 1 mm, pracovní elektroda uhlíková, referenční elektroda Ag/AgCl, pomocná elektroda platinová (BVT Technologies).

3.2 Metodika

3.2.1 Stanovení aktivity AChE spektrofotometricky Ellmanovou metodou

Do standardní umělohmotné kyvety bylo postupně přidáno 400 μ l DTNB o koncentraci 4 mg/ml, 25 μ l roztoku stanovované AChE, 475 μ l fosfátového pufru. Reakce byla spuštěna přidáním 100 μ l roztoku ATChCl o koncentraci 10 mmol/l. Do porovnávací kyvety byly postupně přidány stejné reagenty, ovšem místo 25 μ l roztoku AChE bylo přidáno 25 μ l fosfátového pufru. Byla změřena prvotní absorbance při 412 nm a po 1 minutě byla změřena absorbance při stejné vlnové délce. Rozdíl mezi prvotní absorbancí a absorbancí po 1 minutě je úměrný enzymové aktivitě AChE.

3.2.2 Imobilizační postupy AChE

3.2.2.1 Imobilizace pouhou adsorpcí AChE na povrch senzoru

Na povrch senzoru bylo aplikováno 10 μ l roztoku AChE. Senzory byly usušeny při laboratorní teplotě. Následně byly skladovány v lednici při 4 °C.

3.2.2.2 Imobilizace AChE albuminem za součastného provázání glutaraldehydem.

Byl připraven 10% roztok albuminu ve fosfátovém pufru. Na povrch senzoru bylo aplikováno 1 μ l 10% roztoku albuminu a 15 μ l roztoku AChE. Senzory byly vysušeny při 4 °C v zavřené Petriho misce plně naplněné parami glutaraldehydu a senzory byly uchovávány v lednici při 4 °C.

3.2.2.3 Imobilizace AChE za pomoci želatiny

Byl připraven 0,5% roztok želatiny ve fosfátovém pufru. Na povrch senzoru bylo aplikováno 2,5 μ l 0,5% roztoku želatiny a 15 μ l roztoku AChE. Senzory byly sušeny při laboratorní teplotě a skladovány v lednici při 4 °C.

3.2.2.4 Imobilizace AChE pomocí sol-gel

Do jednorázové zkumavky bylo postupně přidáno 10 μl TMOS, 10 μl MTMOS, 44 μl deionizované vody, 40 μl HCl o koncentraci 1 mol/l a 4 μl PEG 600. Směs byla intenzivně promíchána a uskladněna v lednici při teplotě 4 °C, aby proběhla parciální hydrolyza. Po 24 hodinách bylo smícháno 5 μl sol-gel směsi, 4 μl neionizované vody a 1 μl roztoku AChE. Směs byla pipetována na senzor a ponechána inkubovat při teplotě 4 °C po dobu 24 hodin.

3.2.2.5 Imobilizace AChE do leštěné vrstvy tvořené částicemi grafitu.

Na čistou stranu senzoru, mimo elektrody, byly nanесeny 2 mg uhlíkového prášku a aplikováno 10 μl roztoku AChE. Suspenze byla vysušena a povrch vyleštěn voskovým papírem. Stejným způsobem byly připravené i kontrolní senzory, ale bez AChE. Místo roztoku AChE bylo pipetováno 10 μl fosfátového pufru.

3.2.3 Vyhodnocení optimální reakční koncentrace ATChCl ze saturační křivky

3.2.3.1 Měření s AChE imobilizovanou pomocí želatiny a čistou absorpcí na senzor

Byl připraven zásobní roztok ATChCl o koncentraci 0,1 mol/l, který byl postupně dvojkovou řadou zředěn do koncentrací 0,1 mol/l až $7,81 \times 10^{-4}$ mol/l. Do osmi mikrozkuavek Eppendorf bylo postupně přidáno 450 μl fosfátového pufru, 50 μl ATChCl jednotlivých koncentrací. Výsledná koncentrace ATChCl v mikrozkuavkách bylo $1,0 \times 10^{-2}$ – $7,81 \times 10^{-5}$ mol/l. Do mikrozkuavky s roztokem byl vložen senzor s imobilizovanou AChE a následovala inkubace 5 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl roztok změřen metodou SWV a signál proudu byl vyhodnocen při potenciálu 650 mV.

Experiment byl proveden pro senzor s imobilizovanou AChE pouhou absorpcí a pro senzor s imobilizovanou AChE pomocí želatiny.

3.2.3.2 Měření spektrofotometricky Ellmanovou metodou

Ze zásobního roztoku ATChCl byly ředěním připraveny roztoky o koncentracích 0,1 mol/l až $7,81 \times 10^{-4}$ mol/l. Do osmi standardních umělohmotných kyvet bylo

postupně přidáno 200 μl DTNB o koncentraci 4 mg/ml, 25 μl roztoku AChE, 675 μl fosfátového pufru. Reakce byla spuštěna přidáním 100 μl ATChCl po jednotlivých koncentracích (výsledná koncentrace v kyvetách byla $1 \times 10^{-2} - 7,81 \times 10^{-5}$ mol/l). Byla měřena absorbance po 1 minutě při 412 nm.

3.2.4 Vyhodnocení optimální metody detekce pesticidů biosenzory

3.2.4.1 Cyklická voltametrie

Na elektrodovou část senzoru s imobilizovanou AChE bylo přímo aplikováno 20 μl roztoku ATChCl o koncentraci 1 mmol/l a následně proběhla 5minutová inkubace. Senzory byly změřeny pomocí metody cyklická voltametrie. Byla vyhodnocena výška, umístění a rozlišenost píku, který odpovídal oxidaci thiocholinu.

Experiment byl proveden se senzory:

- s platinovou pracovní elektrodou a s AChE imobilizovanou albuminem
- s platinovou pracovní elektrodou a s AChE imobilizovanou želatinou
- s uhlíkovou pracovní elektrodou a s AChE imobilizovanou albuminem

Hodnoty parametrů CV jsou uvedené v tabulce 2

Tab 2. Parametry CV

| | |
|-----------------|-------|
| E vtx1[V] | 0 |
| E vtx2 [V] | 1 |
| E step [V] | 0.001 |
| E start [V] | 0 |
| scan rate [V/s] | 0.05 |
| n scans | 1 |

E vtx1[V], E vtx2 [V] - minimální a maximální potenciál; E step [V] – velikost jednotlivých kroků potenciálu; E start [V] – počáteční potenciál; scan rate [V/s] – rychlost snímání; n scans – počet cyklů měření.

3.2.4.2 Square-wave voltametrie

Do mikrozkupek Eppendorf bylo postupně přidáno 500 μl fosfátového pufru, 50 μl roztoku ATChCl o koncentraci $1,25 \times 10^{-2}$ mol/l. Výsledná koncentrace ATChCl v mikrozkupech byla 1,13 mmol/l. Do mikrozkupek byl přidán senzor s AChE

imobilizovanou pomocí želatiny a proběhla 5 minut inkubace. Roztok byl změřen metodou SWV. Byla vyhodnocena výška, poloha a rozlišitelnost píku, který odpovídal oxidaci thiocholinu. Hodnoty parametrů SWV jsou uvedené v tabulce 3:

Tab 3. Parametry SWV.

| | |
|-------------|-------|
| E begin [V] | 0 |
| E end [V] | 1.1 |
| E step [V] | 0.005 |
| E ampl [V] | 0.01 |
| F req [Hz] | 1 |

E begin [V] – počáteční potenciál; E end [V] – konečný potenciál; E step [V] – velikost kroku měření; E ampl [V] – amplituda square-wave pulzu; F req [Hz] – frekvence square-wave.

3.2.5 Měření kinetiky reakce podle Michaelis-Mentenové

3.2.5.1 Měření pomocí senzoru s AChE imobilizovanou pomocí želatiny a prostou absorpcí.

Byl připraven zásobní roztok ATChCl o koncentraci 0,1 mol/l, který byl postupně dvojkovou řadou zředěn do koncentrací 0,1 mol/l až $7,81 \times 10^{-4}$ mol/l. Do osmi mikrozkušavek Eppendorf bylo postupně přidáno 450 μ l fosfátového pufru, 50 μ l ATChCl jednotlivých koncentrací. Výsledná koncentrace ATChCl v mikrozkušavkách byla $1,0 \times 10^{-2}$ – $7,81 \times 10^{-5}$ mol/l. Do mikrozkušavky s roztokem byl vložen senzor s imobilizovanou AChE a následovala inkubace 5 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl roztok změřen metodou SWV a signál proudu byl vyhodnocen při potenciálu 650 mV.

Experiment byl proveden pro senzor s AChE imobilizovanou pouhou absorpcí a pro senzor s AChE imobilizovanou pomocí želatiny.

3.2.5.2 Měření spektrofotometricky Ellmanovou metodou

Ze zásobního roztoku ATChCl byly ředěním připraveny roztoky o koncentracích 0,1 mol/l až $7,81 \times 10^{-4}$ mol/l. Do osmi standardních umělohmotných kyvet bylo postupně přidáno 200 μ l DTNB o koncentraci 4 mg/ml, 25 μ l roztoku AChE, 675 μ l

fosfátového pufru. Reakce byla spuštěna přidáním 100 μ l roztoku ATChCl jednotlivých koncentrací (výsledná koncentrace v kyvetách byla $1 \times 10^{-2} - 7,81 \times 10^{-5}$ mol/l). Byla měřena absorbance po 1 minutě při 412 nm.

3.2.6 Měření optimální inkubační doby pro DFP s neimobilizovanou AChE

Do kádinky bylo postupně přidáno 120 μ l AChE, 3,48 ml fosfátového pufru o pH 7,4 a 400 μ l roztoku DFP o koncentraci $1,0 \times 10^{-3}$ mol/l. Výsledná koncentrace DFP ve směsi byla $1,0 \times 10^{-4}$ mol/l. Roztok byl inkubován při laboratorní teplotě 60 minut. V časech 0, 10, 20, 30, 40, 50 a 60 minut bylo ze směsi odebráno do mikrozkušavek 500 μ l roztoku a k němu bylo přidáno 50 μ l roztoku ATChCl o koncentraci 0,011 mol/l (výsledná koncentrace ve směsi byla 1 mmol/l). Mikrozkušavky byly inkubovány po dobu 5 minut a poté roztok byl změřen pomocí senzoru metodou SWV.

3.2.7 Měření inhibičních křivek AChE s isopropylalkoholem, DFP a paraoxon-methylem

3.2.7.1 Měření inhibičních křivek AChE s isopropylalkoholem

Smísením fosfátového pufru o pH 7,4 s isopropylalkoholem byly připraveny roztoky s obsahem 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % a 70 % izopropylalkoholu. Do šesti mikrozkušavek Eppendorf bylo pipetováno 500 μ l jednotlivých roztoků isopropylalkoholu. Do mikrozkušavek byl vložen senzor s imobilizovanou AChE a proběhla 5minutová inkubace. Poté bylo do mikrozkušavek přidáno 50 μ l roztoku ATChCl o koncentraci 0,011 mol/l (výsledná koncentrace v mikrozkušavce byla 1 mmol/l). Následovala 5minutová inkubace a bylo měřeno pomocí biosenzoru metodou SWV.

3.2.7.2 Měření inhibičních křivek AChE kalibrační řadou s DFP

3.2.7.2.1 AChE imobilizovaná želatinou

Zásobní roztok DFP o koncentraci 0,1 mol/l byl ředěn dvojkovou řadou na kalibrační řadu o koncentraci $1,0 \times 10^{-2} - 1,0 \times 10^{-8}$ mol/l. Do mikrozkušavek Eppendorf bylo postupně přidáno 450 μ l fosfátového pufru, 50 μ l DFP v jednotlivých koncentracích (výsledná koncentrace byla $1,0 \times 10^{-3} - 1,0 \times 10^{-9}$ mol/l). Zároveň byla

připravena i kontrola, místo DFP bylo přidáno 50 μ l fosfátového pufru. Do mikrozkušavek byl vnořen senzor s platinovou elektrodou a imobilizovanou AChE. Proběhla 30minutová inkubace při laboratorní teplotě a poté bylo do zkumavek přidáno 50 μ l roztoku ATChCl o koncentraci 0,011 mol/l (výsledná koncentrace v mikrozkušavkách byla 1 mmol/l). Po 5 minutách byly roztoky změřeny pomocí metody SWV a signál proudu vyhodnocen při 650 mV.

3.2.7.2.2 AChE v homogenní fázi

Zásobní roztok DFP o koncentraci 0,1 mol/l byl ředěn dvojkovou řadou na kalibrační řadu o koncentracích $1,0 \times 10^{-2}$ – $1,0 \times 10^{-8}$ mol/l. Do mikrozkušavek Eppendorf bylo postupně přidáno 435 μ l fosfátového pufru, 15 μ l AChE, 50 μ l DFP v jednotlivých koncentracích (výsledná koncentrace byla $1,0 \times 10^{-3}$ – $1,0 \times 10^{-9}$ mol/l). Zároveň byla připravena i kontrola, místo DFP bylo přidáno 50 μ l fosfátového pufru. AChE. Proběhla 30minutová inkubace při laboratorní teplotě a poté bylo do zkumavek přidáno 50 μ l roztoku ATChCl o koncentraci 0,011 mol/l (výsledná koncentrace v mikrozkušavkách byla 1 mmol/l). Po 5 minutách byly roztoky změřeny pomocí senzoru a metody SWV a signál proudu vyhodnocen při 650 mV.

3.2.7.2.3 Kontrolní kalibrační řada DFP pomocí Ellmanovy metody

Zásobní roztok DFP o koncentraci 0,1 mol/l byl ředěn dvojkovou řadou na kalibrační řadu o koncentracích $1,0 \times 10^{-2}$ – $1,0 \times 10^{-8}$ mol/l. Do sedmi standardních umělohmotných kyvet bylo postupně přidáno 400 μ l DTNB o koncentraci 4 mg/ml, 25 μ l roztoku AChE, 450 μ l fosfátového pufru a 25 μ l roztoku DFP v jednotlivých koncentracích (v kyvetách byla výsledná koncentrace $2,78 \times 10^{-4}$ – $2,78 \times 10^{-11}$ mol/l). Dále byl připraven porovnávací roztok, místo 25 μ l DFP přidáno 25 μ l fosfátového pufru. Směs byla promíchána a inkubována 30 min. při laboratorní teplotě. Reakce byla spuštěna přidáním 100 μ l roztoku ATChCl o koncentraci 0,01 mol/l. Byla měřena absorbance po 1 minutě při 412 nm.

3.2.7.3 Měření inhibičních křivek AChE kalibrační řadou s paraoxon-methylem

3.2.7.3.1 AChE imobilizovaná želatinou a prostou adsorpcí

Zásobní roztok paraoxon-methylu o koncentraci 0,1 mol/l byl ředěn dvojkovou řadou na kalibrační řadu o koncentracích $1,0 \times 10^{-2} - 1,0 \times 10^{-8}$ mol/l. Do mikrozkušavek Eppendorf bylo postupně přidáno 450 μ l fosfátového pufru, 50 μ l paraoxon-methylu v jednotlivých koncentracích (výsledná koncentrace byla $1,0 \times 10^{-3} - 1,0 \times 10^{-9}$ mol/l). Zároveň byla připravena i kontrola, místo paraoxon-methylu bylo přidáno 50 μ l fosfátového pufru. Do mikrozkušavek byl přidán senzor s platinovou elektrodou a imobilizovanou AChE. Proběhla 30minutová inkubace při laboratorní teplotě a poté bylo do zkumavek přidáno 50 μ l roztoku ATChCl o koncentraci 0,011 mol/l (výsledná koncentrace v mikrozkušavkách byla 1 mmol/l). Po 5 minutách byly roztoky změřeny pomocí metody SWV a signál proudu vyhodnocen při 650 mV.

Experiment byl proveden pro senzor s AChE imobilizovanou pouhou absorpcí a pro senzor s AChE imobilizovanou pomocí želatiny.

3.2.7.3.2 AChE neimobilizovaná v roztoku

Zásobní roztok paraoxon-methylu o koncentraci 0,1 mol/l byl ředěn dvojkovou řadou na kalibrační řadu o koncentracích $1,0 \times 10^{-2} - 1,0 \times 10^{-8}$ mol/l. Do mikrozkušavek Eppendorf bylo postupně přidáno 435 μ l fosfátového pufru, 15 μ l AChE, 50 μ l paraoxon-methylu v jednotlivých koncentracích (výsledná koncentrace byla $1,0 \times 10^{-3} - 1,0 \times 10^{-9}$ mol/l). Zároveň byla připravena i kontrola, místo paraoxon-methylu bylo přidáno 50 μ l fosfátového pufru. Proběhla 30minutová inkubace při laboratorní teplotě a poté bylo do zkumavek přidáno 50 μ l roztoku ATChCl o koncentraci 0,011 mol/l (výsledná koncentrace v mikrozkušavkách byla 1 mmol/l). Po 5 minutách byly roztoky změřeny pomocí senzoru a metody SWV a signál proudu vyhodnocen při 650 mV.

3.3 Ochrana před toxickými látkami a odmořování kontaminovaných ploch

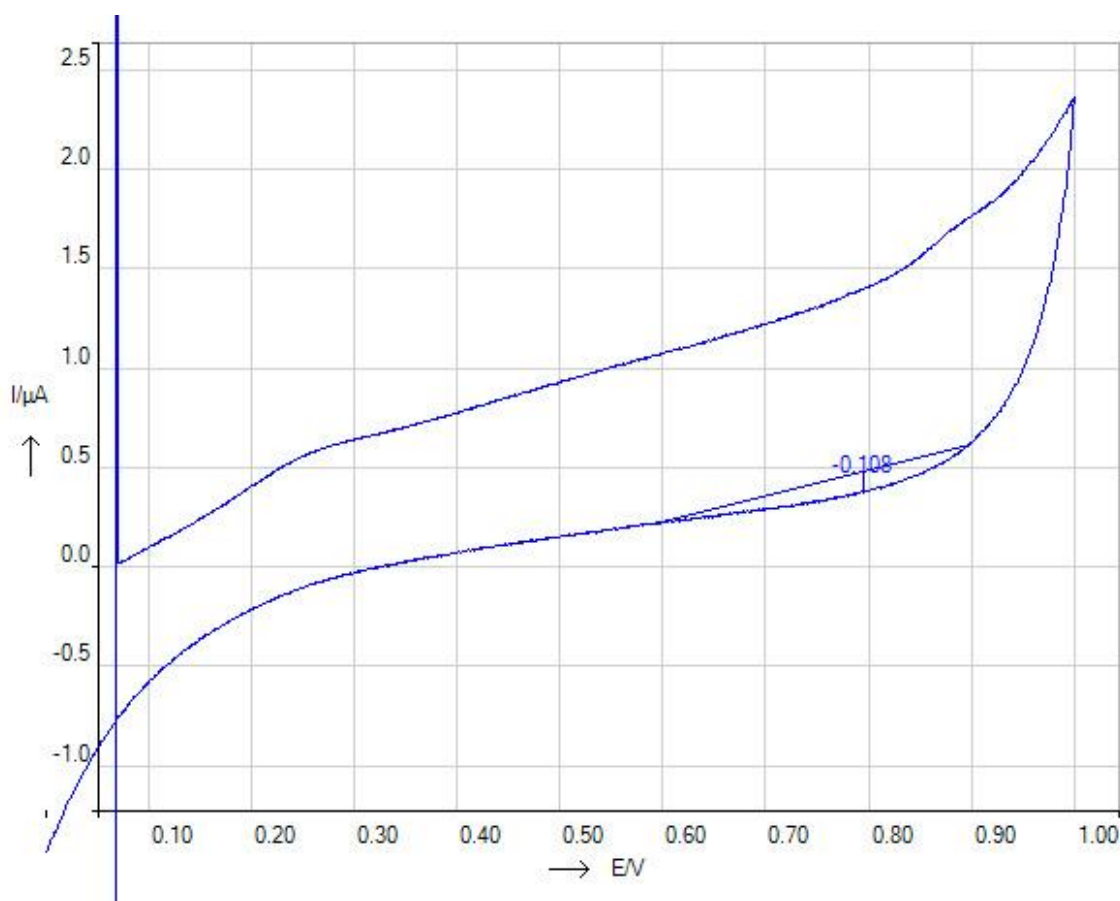
Jako ochranu před toxickými látkami v laboratoři jsem používal plášť, přezůvky a polyethylenové rukavice. S otravnými látkami jako paraoxon-methyl, DFP jsem pracoval v digestoři.

Dále jsem byl poučen, že v případě zasažení kůže otravnými látkami je v laboratoři k dispozici protichemický přípravek, který obsahuje Desprach (jemně mletý bentonit s vysokou absorpční schopností). Prášek se nasype na kontaminovanou plochu a po absorpci z povrchu smete. V případě zasažení očí byla k dispozici oční sprcha s čistou vodou.

4. Výsledky a diskuse

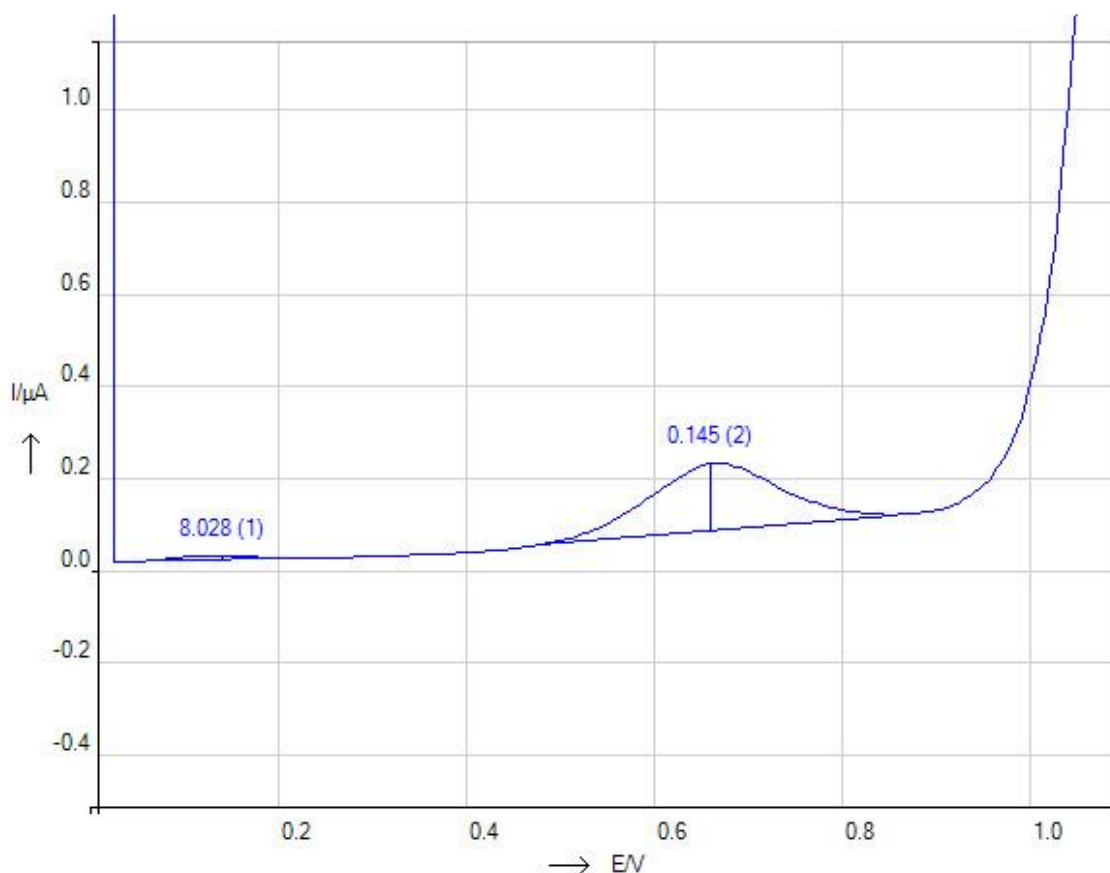
4.1 Výběr měřicí metody

Na počátku měření byly provedeny experimentální testy pro výběr voltametrické techniky. S ohledem na přístrojové a softwarové vybavení byla technická možnost použít buď CV, nebo SWV. Obr. 1 představuje typický tvar voltamogramu poskytnutý CV. Změřený proud během celého měření narůstal a na výsledném voltamogramu se podílela polarizace elektrod a v koncové oblasti také elektrolyza vody. Vrchol píku, který odpovídal oxidaci thiocholinu, se nacházel při potenciálu 799 mV. Elektrolyza vody začínala při potenciálu 900 mV. Z obrázku je viditelné, že voltamogram poskytnutý CV, neměl úplně zřetelný pík. V tomto případě pík označil ovládací software PSLite. Ovšem často docházelo k tomu, že pík byl ještě méně zřetelný a software PSLite jej nerozpoznal vůbec nebo jej chybně lokalizoval.



Obr 1: Příklad CV pro roztok ATChCl o koncentraci 1 mmol/l, závislost proudu na potenciálu. Parametry analýzy jsou uvedené v tabulce 2 v kapitole 3.2.4.1.

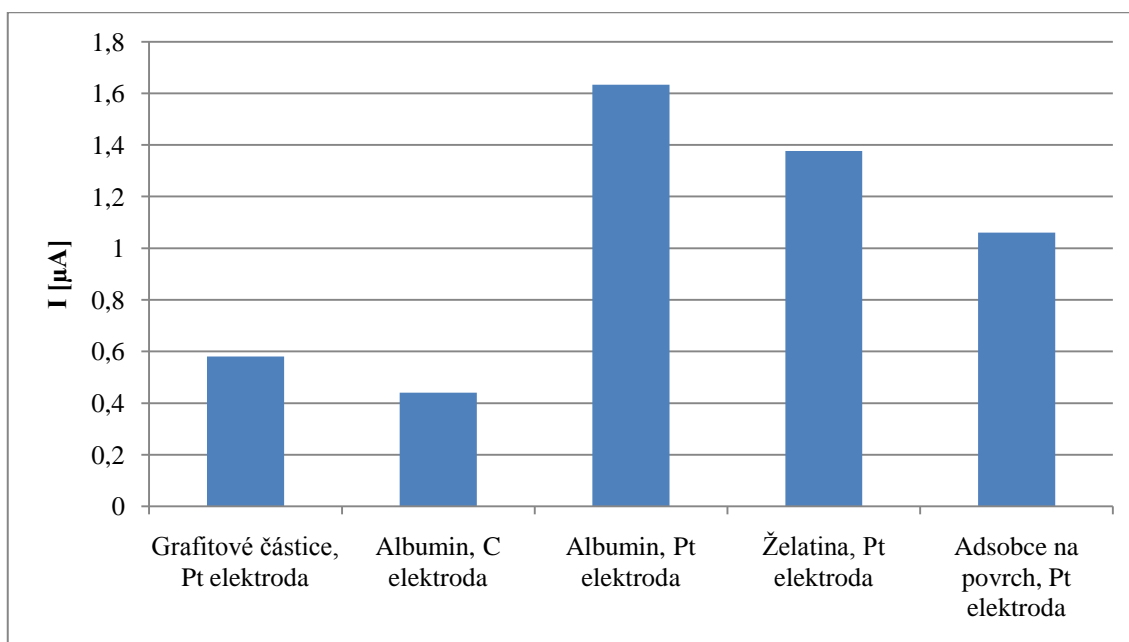
Na Obr. 2 je voltamogram SWV a je z něj patrné, že pík odpovídající oxidaci thiocholinu je mnohem zřetelnější, než tomu bylo u voltamogramu CV. Dále polarizace elektrod téměř neovlivnila voltamogram a k elektrolýze vody docházelo při napětí kolem 900 mV. Literatura uvádí, že oxidace thiocholinu začíná probíhat při 410 mV (v případě platinové pracovní elektrody a referentní argentochloridové elektrody), využívané při chronoamperometrických metodách [26]. Ovšem vrchol píku je dosažen až při potenciálu okolo 660 mV. Vzhledem k tomu, že pík byl na voltamogramu SWV lépe viditelný, při dalším měření jsme používali SWV. Další výhodou bylo, že software PSLite dokázal častěji a správně detekovat polohu píku, což umožnilo rychlejší a přesnější odečítání výsledku. U získaných dat lze rovněž očekávat lepší reprodukovatelnost.



Obr 2: Voltamgram SWV roztoku ATChCl o koncentraci 1 mmol/l, závislost proudu na potenciálu. Parametry analýzy jsou uvedené v tabulce 3 v kapitole 3.2.4.2.

4.2 Imobilizace

Základním předpokladem pro úspěšnou funkci biosenzoru je zvládnutí optimálního imobilizačního postupu. Proto byla hodnocena úspěšnost jednotlivých imobilizačních postupů AChE na keramický povrch sítotiskových senzorů. Byly vybrány následující metody: prostá adsorpce na povrch senzoru, imobilizace pomocí želatiny, dále imobilizace albuminem za současného provázání glutaraldehydem, imobilizace pomocí sol-gel a imobilizace do leštěné vrstvy tvořené částicemi grafitu. Obr. 3 přehledně porovnává úspěšnost jednotlivých imobilizačních postupů a jednotlivých senzorů.



Obr 3: Proud odpovídající píku 1 mM ATChCl, porovnání jednotlivých elektrod a imobilizačních metod. Měřeno metodou SWV.

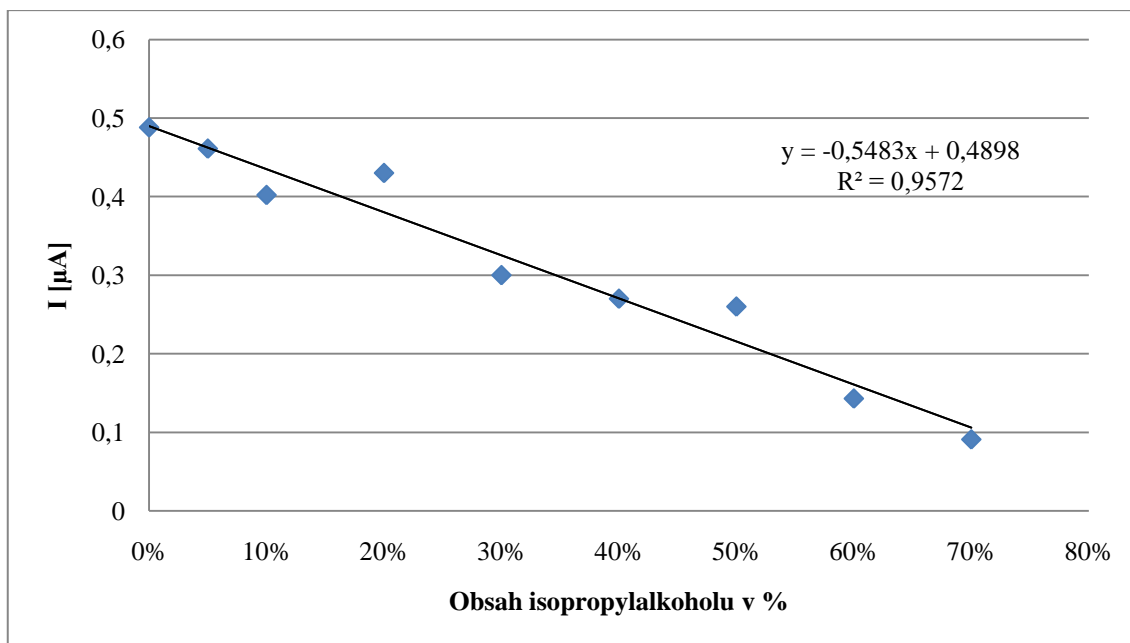
V Obr. 3 není uvedena metoda sol-gel, protože se ukázala jako nevhodná pro keramický senzor, přestože sol-gel imobilizace AChE byla úspěšná v řadě prací, včetně zde zmíněné citace [28]. V našem případě totiž docházelo k mechanickému oddělování biorekogničního elementu od fyzikálně-chemického převodníku. Důvodem může být to, že keramická část senzoru, na kterou byla imobilizována AChE pomocí sol-gelu, není dostatečně pórovitá, takže sol-gel nepřilnul dostatečně k senzoru a došlo k oddělení. Dá se rovněž předpokládat bránění slinutí sol-gel vrstvy s keramickým povrchem

následkem přítomnosti organických stabilizujících látek. Další nevýhodou sol-gel metody byla její pracnější a časově náročnější příprava. Imobilizace AChE do grafitových částic se také ukázala jako méně úspěšná. Senzor, který měl pracovní elektrodu uhlíkovou a AChE byla imobilizována pomocí albuminu za současného provázání glutaraldehydem, se jeví jako neperspektivní pro další měření. Uhlíkový senzor poskytoval proudový signál v řádech nA, zatím co platinový řádově až μA . Dále nebyly píky dostatečně ohraničené a křivky neměly hladký průběh, což znesnadnilo odečet výšky píku. Z tohoto důvodu, jsme dále uhlíkové senzory v následujících experimentech nepoužívali.

Nejvhodnější metoda byla imobilizace pomocí albuminu za současného provázání glutaraldehydem. Zachycení AChE pomocí želatiny se jeví jako méně vhodné. Čistá adsorpce na povrch senzoru poskytovala dobré výsledky, ovšem otázkou zůstává, jestli dlouhodobější uchovávání senzoru v testovaném roztoku nezpůsobovalo, že se AChE postupně uvolňovala z povrchu biosenzoru.

4.3 Inhibice AChE isopropylalkoholem

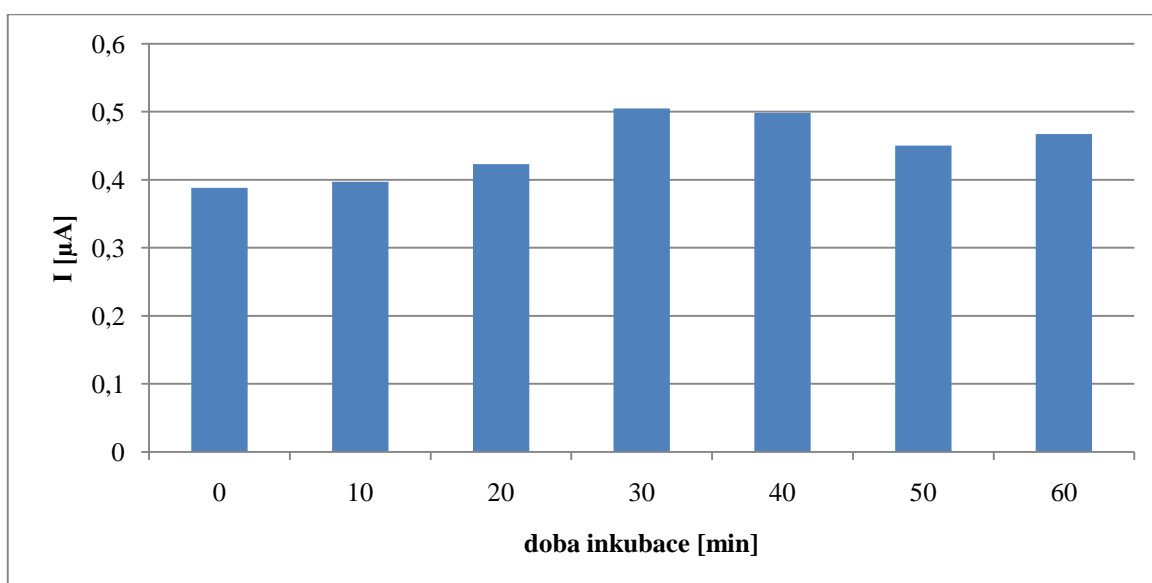
Paraoxon-methyl a DFP byly kvůli stabilitě při skladování připraveny rozpuštěním v isopropylalkoholu. Proto bylo nutné stanovit míru inhibice AChE isopropylalkoholem. Z Obr. 4 je patrné, že isopropylalkohol způsoboval inhibici AChE, což by mohlo vést k falešně pozitivním výsledkům při měření kalibračních křivek DFP a paraoxon-methylu. V následujících experimentech byly používány roztoky vzorových organofosfátů s koncentrací isopropylalkoholu maximálně 5 %, protože tato koncentrace snižovala výsledný proud jen v setinách μA a tím pádem neovlivňovala získaná data významnějším způsobem.



Obr 4: Závislost proudu oxidace thiocholinu na rostoucím obsahu isopropylalkoholu. Měřeno pomocí biosenzoru s imobilizovanou AChE pouhou adsorpcí. ATChCl v koncentraci 1 mmol/l, metoda SWV.

4.4 Inkubační doba

Bylo nutné stanovit nejvhodnější inkubační čas pro modelové vzorky DFP a paraoxon-methyl. Oba použité organofosfáty patří mezi ireverzibilní inhibitory, proto stačilo vyhodnotit nejvhodnější čas jen pro jeden ze vzorků, v našem případě DFP, protože je stabilnější. Výsledek experimentu je prezentovaný na obrázku 5.



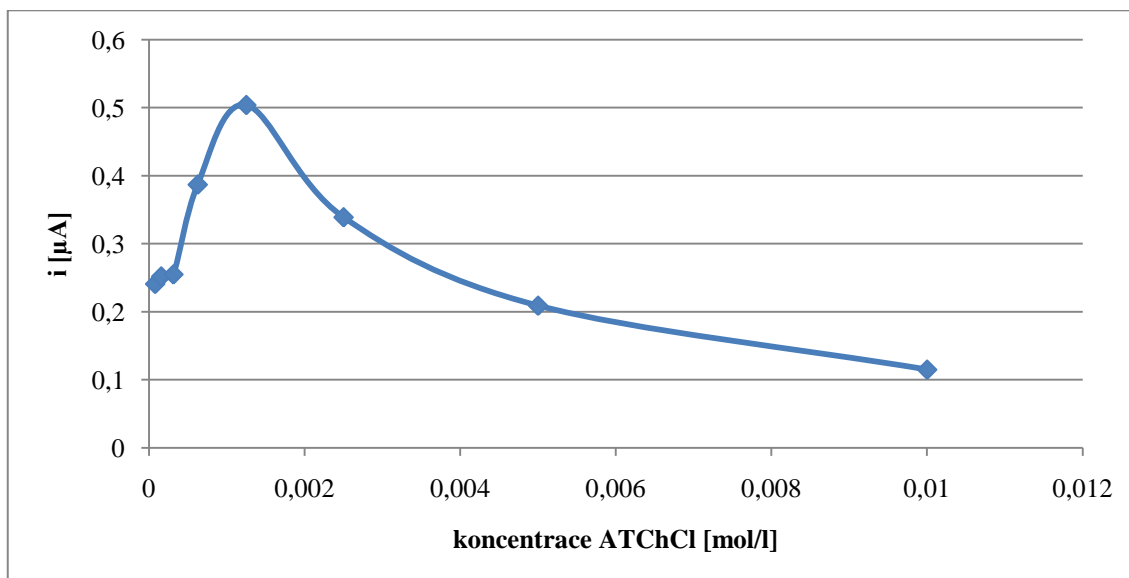
Obr 5: Závislost proudu oxidace thiocholinu na době inkubace roztoku DFP o koncentraci $1,0 \times 10^{-4}$ mol/l s AChE. ATChCl v koncentraci 1 mmol/l. Měřeno metodou SWV.

Z Obr. 5 je patrné, že doba inkubace nemá na aktivitu AChE významný vliv. Jako nejvhodnější doba byla zvolena inkubace 30 minut.

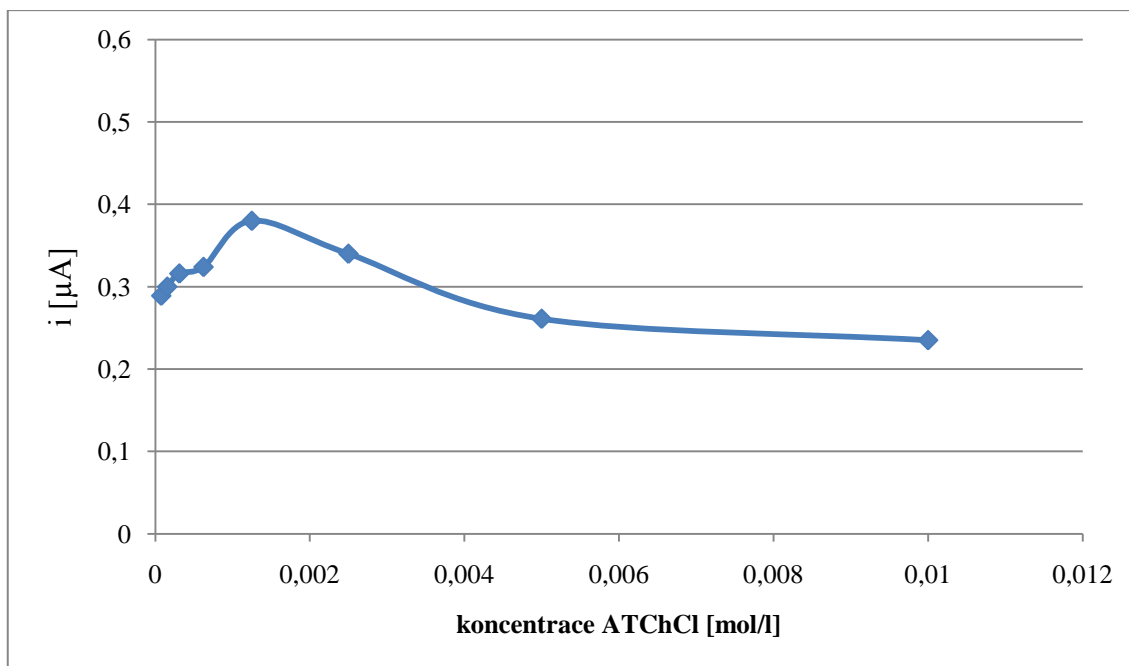
4.5 Optimalizace reakčních podmínek

Dalším úkolem v rámci optimalizace reakčních podmínek bylo určit a vybrat optimální koncentraci ATChCl. Na Obr. 6 je prezentována saturační křivka naměřená pro biosenzor s AChE imobilizovanou pomocí prosté adsorpce na povrch senzoru a na Obr. 7 pro biosenzor s AChE imobilizovanou pomocí želatiny. Obr. 8 prezentuje saturační křivku naměřenou spektrofotometricky Ellmanovou metodou a slouží jako kontrola. V grafech je znázorněna závislost proudového signálu, který je přímo úměrný počáteční rychlosti enzymové přeměny na koncentraci substrátu.

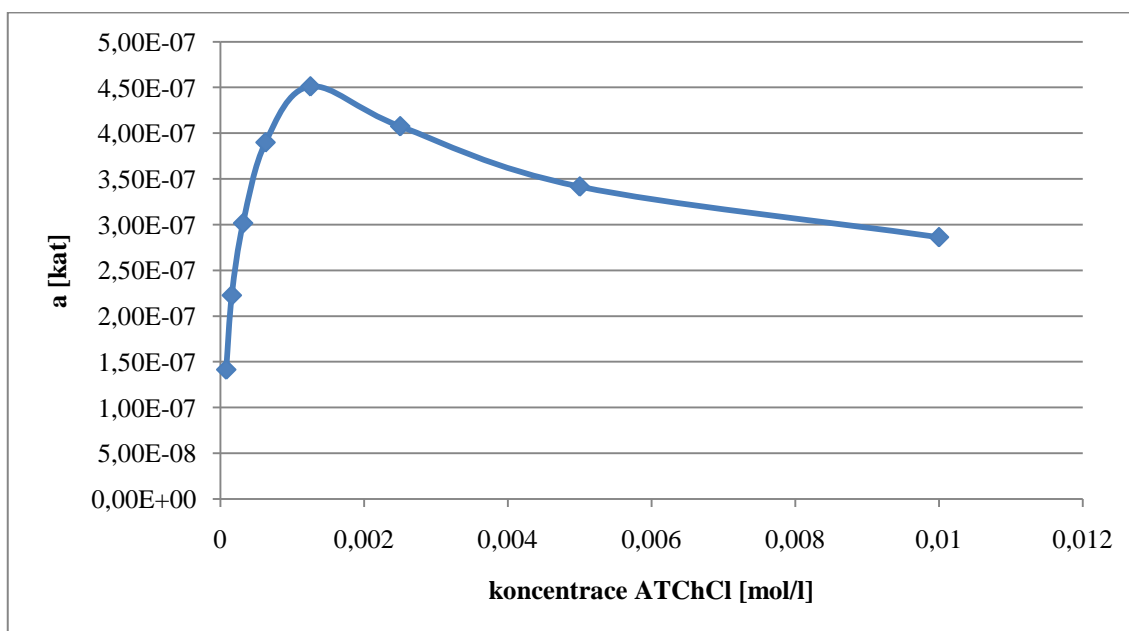
Nejvyšší proudovou odezvu jsme zaznamenali při koncentraci ATChCl 1,25 mmol/l, což se nám potvrdilo při kontrole pomocí spektrofotometrie Ellmanovou metodou. I zde se ukázalo, že nejvyšší odezva byla při koncentraci ATChCl 1,25 mmol/l. Jako optimální koncentraci ATChCl jsme zvolili 1 mmol/l, protože ta je nezávisle využívána v řadě odborných prací, včetně zde zmíněné citace [29]. Ze saturačních křivek je patrné, že po dosažení maximálního signálu, došlo k poměrně značnému poklesu. Důvodem je to, že AChE může být inhibována nadbytkem substrátu.



Obr 6: Saturační křivka, závislost proudu na koncentraci substrátu. ATChCl v koncentraci $1,0 \times 10^{-2}$ až $7,8 \times 10^{-5}$ mol/l. AChE imobilizována prostou adsorpcí. Použita metoda SWV.



Obr 7: Saturační křivka, závislost proudu na koncentraci substrátu. ATChCl v koncentraci $1,0 \times 10^{-2}$ až $7,8 \times 10^{-5}$ mol/l. AChE imobilizována pomocí želatiny. Použita metoda SWV.



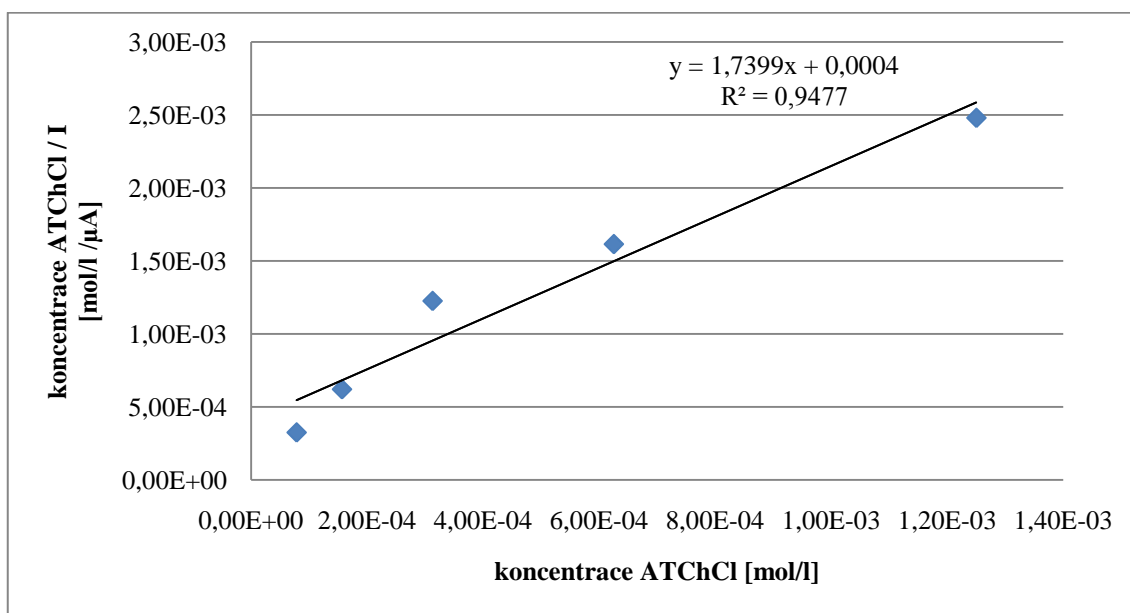
Obr 8: Saturační křivka, závislost aktivity AChE na koncentraci substrátu. ATChCl v koncentraci $1,0 \times 10^{-2}$ až $7,8 \times 10^{-5}$ mol/l. Měřeno spektrofotometricky Ellmanovou metodou.

V Tab. 4 jsou přehledně uvedené hodnoty V_{\max} a vypočítaná Michaelisova konstanta K_M . Hodnota K_M byla vypočítána z linearizace rovnice Michaelis-Mentenové podle Hanes-Woolfa. Na Obr. 9, 10 a 11 jsou grafy linearizace.

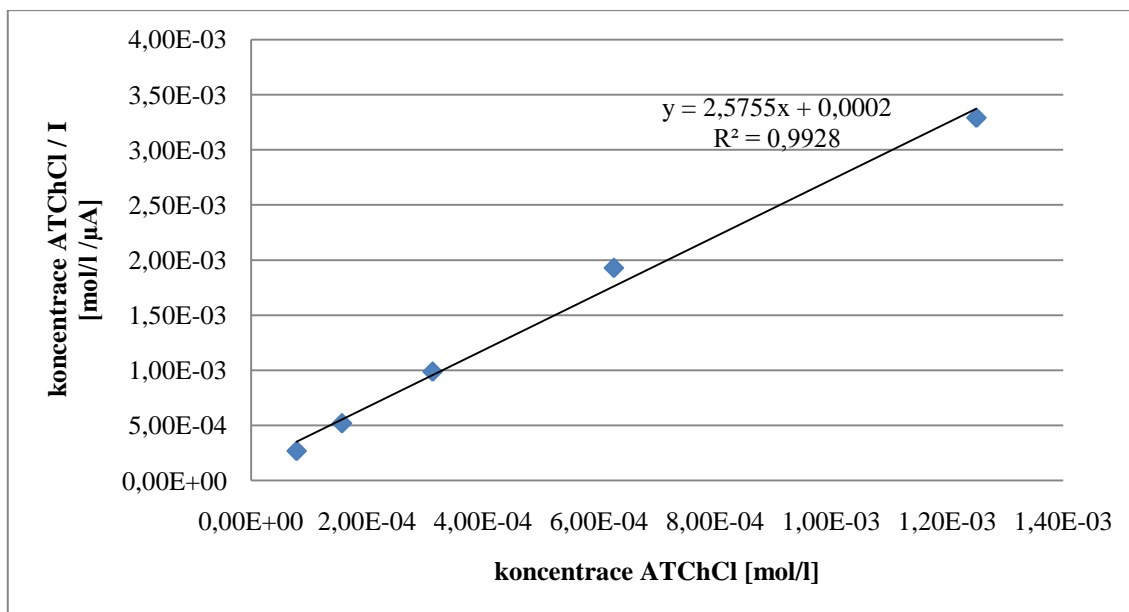
Tab. 4: Přehled hodnot V_{\max} a K_M vzhledem ke způsobu imobilizace a metody měření.

| metoda/způsob imobilizace | V_{\max} | K_M ($\mu\text{mol/l}$) |
|---------------------------|---------------------|-----------------------------|
| Biosenzor/adsorpce | 0,504 μA | 230 |
| Biosenzor/želatina | 0,380 μA | 78,0 |
| Spektrofotometrie | 0,451 mol/s | 209 |

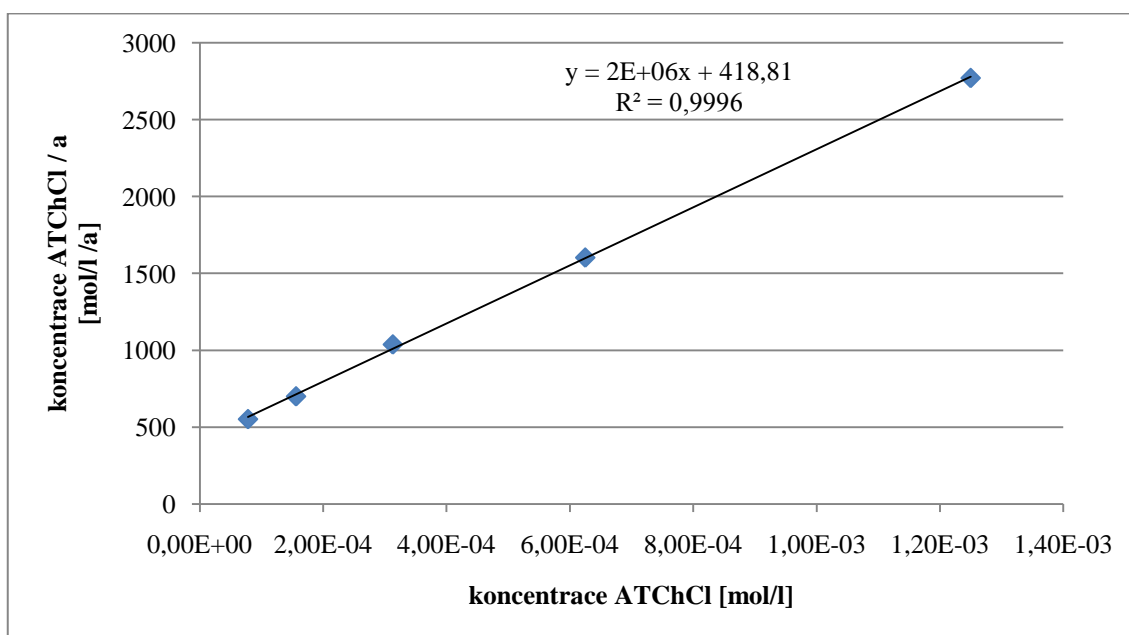
Z Tab. 4 je viditelné, že hodnoty K_M se liší. Hodnota K_M u biosenzoru s AChE imobilizovanou pomocí želatiny je výrazně nižší ve srovnání s ostatními hodnotami K_M . Lze to vysvětlit tím, že želatina je překážka, přes kterou může substrát obtížně difundovat. Na druhou stranu, hodnota K_M u biosenzoru s AChE imobilizovanou pomocí prosté adsorpce se výrazně neliší od hodnoty K_M získané pomocí spektrofotometrie. Jeden z možných důvodů může být ten, že AChE imobilizovaná prostou adsorpcí je výrazně přístupnější substrátu a navíc může i docházet k jejímu uvolňování do analyzovaného roztoku, což její přístupnost pro substrát ještě zvýší.



Obr. 9: Linearizace rovnice Michaelis-Mentenové podle Hanes-Woolfa. Měřeno s biosenzorem s AChE imobilizovanou prostou adsorpcí, ATChCl v koncentraci $1,0 \times 10^{-2}$ až $7,8 \times 10^{-5}$ mol/l. Použita metoda SWV.



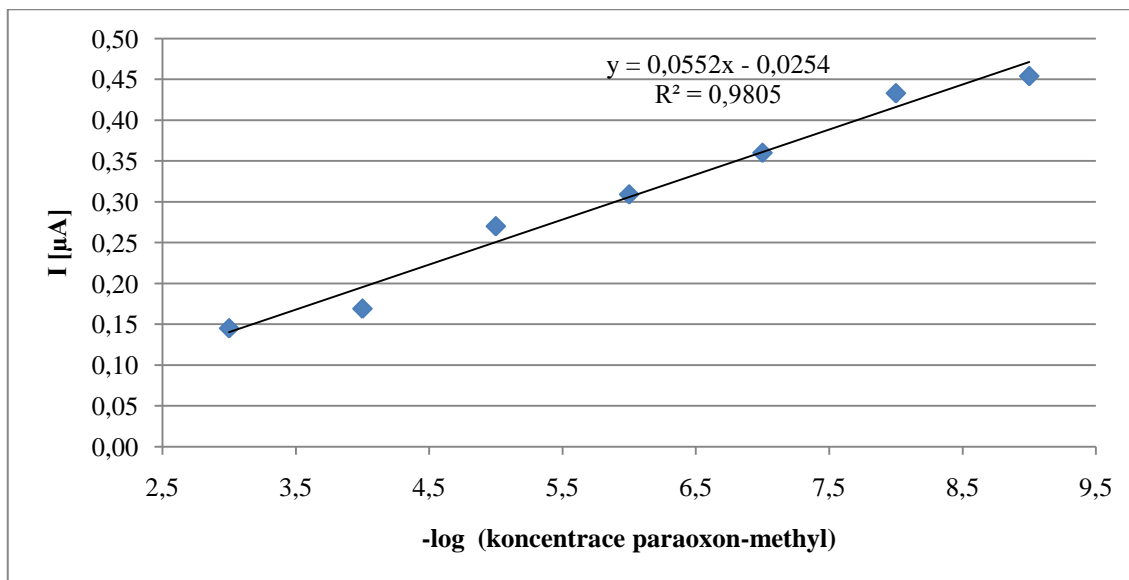
Obr. 10: Linearizace rovnice Michaelis-Mentenové podle Hanes-Woolfa. Měřeno s biosenzorem s AChE imobilizovanou pomocí želatiny, ATChCl v koncentraci $1,0 \times 10^{-5}$ až $7,8 \times 10^{-5}$ mol/l. Použita metoda SWV.



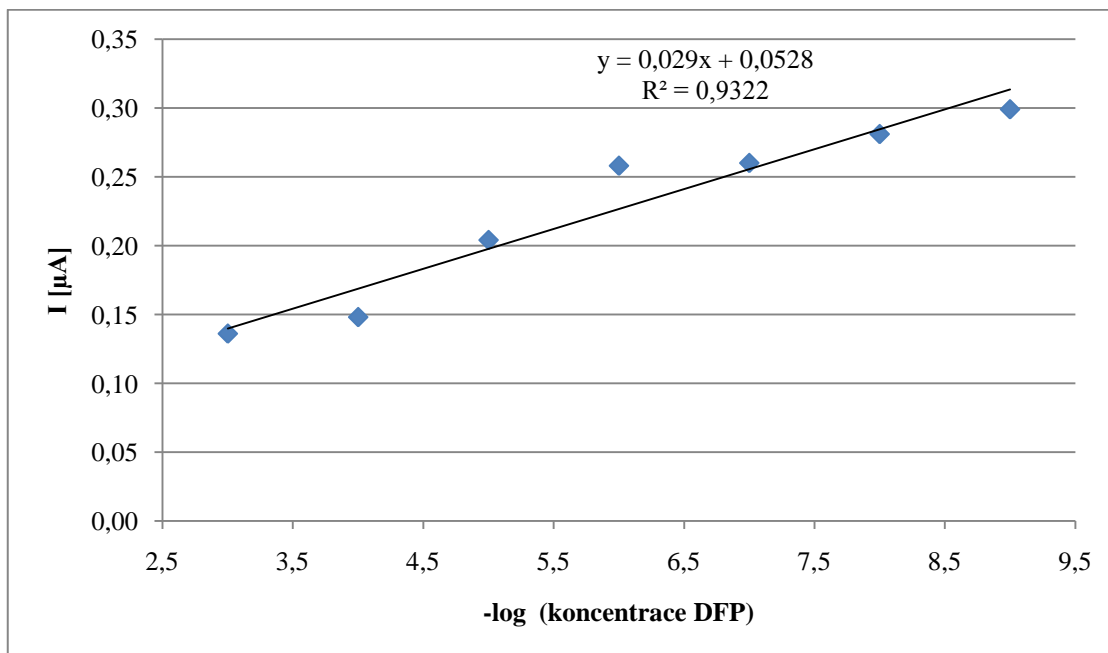
Obr. 11: Linearizace rovnice Michaelis-Mentenové podle Hanes-Woolfa. Měřeno spektrofotometricky pomocí Ellmanovy metody, ATChCl v koncentraci $1,0 \times 10^{-5}$ až $7,8 \times 10^{-5}$ mol/l.

4.6 Kalibrace paraoxon-methyl a DFP

Obr. 12 a 13 prezentují kalibrační křivky pro DFP a paraoxon-methyl. V obou případech byla použita metoda SWV, měřeno pomocí biosenzoru s AChE v homogenní fázi, tzn. neimobilizovanou AChE.



Obr. 12: Závislost proudu při oxidaci thiocholinu na záporném logaritmu koncentrace paraoxon-methylu. Koncentrace ATChCl 1 mmol/l, měřeno pomocí SWV.

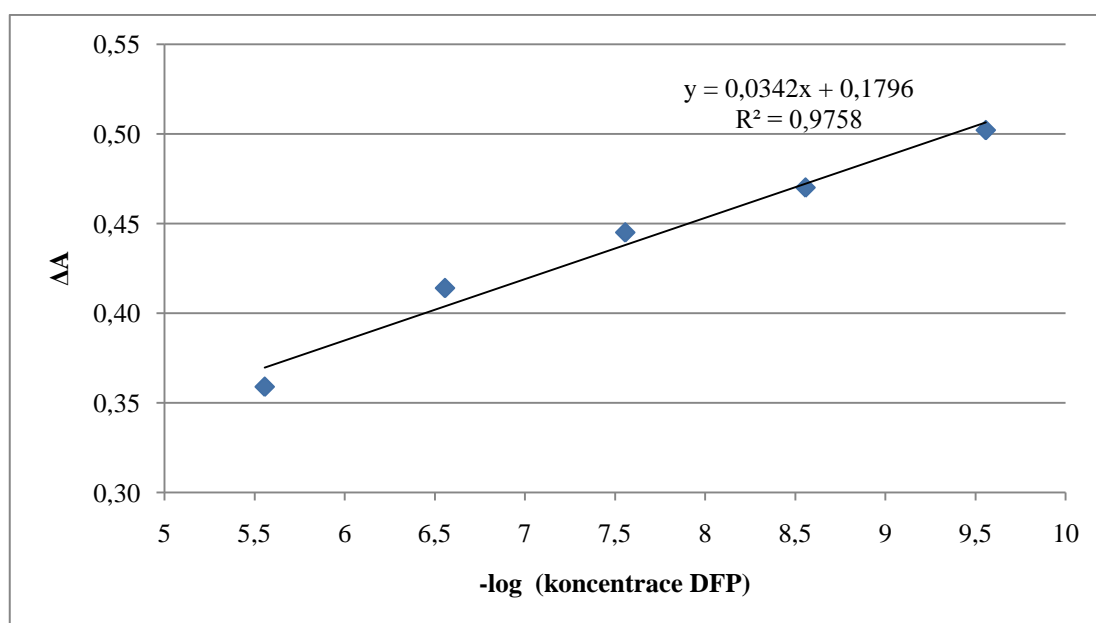


Obr. 13: Závislost proudu při oxidaci thiocholinu na záporném logaritmu koncentrace DFP. Koncentrace ATChCl 1 mmol/l, měřeno pomocí SWV.

Dále byla stanovena mez detekce (LOD, limit of detection). LOD byla stanovena metodou analýzy opakovaného slepého pokusu. Jedná se o koncentraci inhibitoru, která odpovídá trojnásobku průměrné odezvy slepého pokusu s přičtením směrodatné odchylky. LOD pro paraoxon-methyl byla stanovena na koncentraci $6,05 \times 10^{-5}$ mol/l a pro DFP $4,52 \times 10^{-6}$ mol/l.

I přes opakované pokusy se nám nepodařilo správně změřit a stanovit kalibrační křivky pro DFP a paraoxon-methyl pomocí biosenzorů s AChE imobilizovanou pomocí želatiny a prosté adsorpce. Důvodem může být, že během skladování nebo sušení senzorů mohlo dojít k denaturaci AChE.

Dále byla kalibrace DFP za použití spektrofotometrie. Cílem bylo ověření funkčnosti metody založené na inhibici AChE pomocí DFP. Výsledný graf kalibrace je uveden na Obr. 14.



Obr 14: Závislost minutové změny absorbance na záporném logaritmu koncentrace DFP. Koncentrace ATChCl 1 mmol/l, měřeno spektrofotometricky pomocí Ellmanovy metody.

Z výsledků je patrné, že biosenzory zkonstruované a použité v této práci představují oproti jiným metodám rychlou a dostatečně citlivou metodu pro stanovení OP. Ze způsobů imobilizace AChE se jeví nejlépe imobilizace pomocí želatiny a albuminem provázaným pomocí glutaraldehydu. Možným problémem se jeví stabilita

imobilizované AChE. Pokud by došlo k odstranění tohoto problému, biosenzory by se mohly stát vhodnou alternativou při detekci a stanovení OP. Na principu biosenzorů, které popisuje tato práce, byla již dříve zkonstruována a prakticky použita řada biosenzorů, jak je patrné z reference [30].

5. Závěr

Jedním z cílů této diplomové práce bylo připravit funkční biosenzor, který by se dal použít pro stanovení OP. Pro konstrukci tohoto biosenzoru byly použité tříelektrodové senzory vyrobené pomocí sítotisku. Nejvhodnější se ukázaly senzory s platinovou pracovní elektrodou v kombinaci s argentochloridovou referenční a platinovou pomocnou elektrodou.

Nejvhodnější metoda detekce OP se jevila SWV, která má lépe ohraničené píky a lepší softwarovou detekci píků. Dále bylo srovnáno několik metod imobilizace AChE s nejlepšími experimentálními výsledky imobilizace AChE pomocí albuminu provázaného glutaraldehydem a také imobilizace pomocí želatiny. Dle literatury se jevila velmi perspektivně metoda sol-gel, ovšem v tomto případě se ukázala jako nevhodná.

Podařilo se optimalizovat některé reakční podmínky, a to koncentraci substrátu, dobu inkubace pro modelové vzorky DFP a paraoxon-methylu a byla vyhodnocena mez detekce. Ukázalo se, že připravené biosenzory měly dobrý LOD. Testované pesticidy bylo možné detekovat v mikromolárních koncentracích. Získané výsledky naznačují, že biosenzory mají potenciál pro další rozvoj a jeví se jako vhodná alternativa k současně používaným metodám detekce pesticidů.

6. Literatura:

1. COKUGRAS A. Butyrylcholinesterase: structure and physiological importance. *Turk. J. Biochem.*, 2003, roč. 28, č. 2, s. 54-61.
2. LINCOVÁ D., FARGHALI H. et al. *Základní a aplikovaná farmakologie*, 1. vyd. Praha: Galén, 2002.
3. ŠTĚPÁNKOVÁ Š., KOMERS K. Cholinesterases and cholinesterase inhibitors. *Curr. Enzym. Inhib.*, 2008, roč. 3, č. 4, s. 160-171.
4. PATOČKA J., KUČA K., JUN D. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase – important enzymes of human body. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 2004, roč. 47, č. 4, s. 215-228.
5. LÜLLMANN H., MOHR K., WEHLING M. *Farmakologie a toxikologie*, 1. české vyd. Praha: Grada, 2002.
6. SILMAN I., SUSSMAN J.: Acetylcholinesterase: how is structure related to function? *Chem.-Biol. Interact.*, 2008, roč. 175, č. 1-3, s. 3-10.
7. ROSENBERRY T., JOHNSON J., CUSACK B., THOMAS J., EMANI S., VENKATASUBBAN K. Interactions between the peripheral site and the acylation site in acetylcholinesterase. Proceedings of the VIII International Meeting on Cholinesterases, Perugia (Italy), 26-30 September 2004. TALESA V. N., ANTOGNELLI C. (Eds). In *Chem.-Biol. Interact.*, 2005, roč. 157-158, s. 181-189.
8. DRTINOVÁ L., OPLETALOVÁ V., POHANKA M. Organofosfátové pesticidy. *Vojen. Zdrav. Listy*, 2009, roč. 78, č. 2, s. 54-59.
9. DAWSON A., EDDLESTON M., SENERATHNA L., MOHAMED F., GAWARAMMANA I., BOWE S., MANUWEERA G., BUCKLEY N. Acute

- human lethal toxicity of agricultural pesticides: a prospective cohort study. *PLoS Med.*, 2010, roč. 7, č. 10, s. 1-10.
10. EDDLESTON M., PHILLIPS M. Self poisoning with pesticides. *Brit. Med. J.* 2004, roč. 328, č. 7430, s. 42-44
 11. PATOČKA J. Kdo syntetizoval první organofosfátový inhibitor acetylcholinesterasy? *Vojen. Zdrav. Listy*, 2010, roč. 79, č. 3, s. 126-128.
 12. BAJGAR J. Optimal choice of acetylcholinesterase reactivators for antidotal treatment of nerve agent intoxication, *Acta Medica (Hradec Králové)*, 2010, roč. 53, č. 4, s. 207-211.
 13. AARDEMA H., MEERTENS J., LIGTENBERG J., PETERS-POLMAN O., TULLEKEN J., ZIJLSTRA J. Organophosphorus pesticide poisoning: cases and developments. *Neth. J. Med.*, 2008, roč. 66, č. 4, s. 149-153.
 14. JOKANOVIĆ M. Medical treatment of acute poisoning with organophosphorus and carbamate pesticides. *Toxicol. Lett.*, 2009, roč. 190, č. 2, s. 107-115.
 15. EDDLESTON M., DAWSON A., KARALLIEDDE L., DISSANAYEKE W., HITTARAGE A., AZHER S., BUCKLEY N. Early management after self-poisoning with an organophosphorus or carbamate pesticide – a treatment protocol for junior doctors. *Crit. Care*, 2004, roč. 8, č. 6, s. 391-397.
 16. FIŠAR Z., HROUDOVÁ J., KORÁBEČNÝ J., MUSÍLEK K., KUČA K. In vitro effects of acetylcholinesterase reactivators on monoamine oxidase activity. *Toxicol. Lett.*, 2011, roč. 201, č. 2, s. 176-180.
 17. SMULDERS C., BUETERS T., VAN KLEEF R., VIJVERBERG H. Selective effects of carbamate pesticides on rat neuronal nicotinic acetylcholine receptors and rat brain acetylcholinesterase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2003, roč. 193, č. 2, s. 139-146.
 18. POHANKA M. Elektrochemické biosenzory. *Zpravodaj vojenské farmacie*, 2007, roč. 17, č. 2, s. 32-34.

19. NAGEL B., DELLWEG H., GIERASCH L. Glossary for chemists of terms used in biotechnology. *Pure Appl. Chem.* 1992, roč. 64, č. 1, s. 143-168.
20. POHANKA M. *Biosenzory pro stanovení chemických a biologických agens*. 1. vyd., Hradec Králové: Univerzita obrany, 2009.
21. THÉVENOT D., TOTH K., DURST R., WILSON G. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.*, 2001, roč. 16, č. 1-2, s. 121-131.
22. POHANKA M., SKLÁDAL P., KROČA M. Biosensors for biological warfare agent detection. *Def. Sci. J.*, 2007, roč. 57, č. 3, s. 185-193.
23. POHANKA M., SKLÁDAL P. Electrochemical biosensors – principles and applications. *J. Appl. Biomed.*, 2008, roč. 6, č. 2, s. 57-64.
24. POHANKA M., KUČA K. Testing of cholinesterase inhibitors using biosensor technology. In *Central and peripheral nervous system: effects of highly toxic organophosphates and their antidotes*. BAJGAR J. (Ed.), Trivandrum (India): Reaserch Signpost, 2009, pp. 51-59.
25. POHANKA M.: Piezoelektrické biosenzory. *Zpravodaj vojenské farmacie*, 2007, roč. 17, č. 4, s. 15-17.
26. POHANKA M., KUČA K., JUN D. Možnosti využití cholinesteráz ke konstrukci biosenzorů. *Vojen. Zdrav. Listy*, 2007, roč. 76, č. 5, s. 187-191.
27. POHANKA M., KUČA K., JUN D. Optimalization of acetylcholinesterase immobilization onto screen printed platinum electrode. *J. Appl. Biomed.*, 2008, roč. 6, č. 1, s. 27-30.
28. DONDOI M. P., BUCUR B., DANET A. F., TOADER C. N., BARTHELMEBS L., MARTY J. Organophosphorus insecticides extraction and heterogeneous oxidation on column for analysis with an acetylcholinesterase (AChE) biosensor. *Anal. Chim. Acta*, 2006, roč. 578, č. 2, s. 162-169.

29. ANDREESCU S., BARTHELMEBS L., MARTY J. Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes: comparative study between three immobilization methods and applications to the detection of organophosphorus insecticides. *Anal. Chim. Acta*, 2002, roč. 464, č. 2, s. 171-180.
30. POHANKA M., KUČA K., JUN D. Amperometric biosensor for pesticide methamidophos assay. *Acta Medica (Hradec Králové)*, 2007, roč. 50, č. 4, s. 239-241.